

EXPRESSION VON CONNEXIN 43 IM GEHIRN NACH EINER
FOKALEN KORTIKALEN ISCHÄMIE -
MOLEKULARBIOLOGISCHE UND IMMUNHISTOCHEMISCHE
CHARAKTERISIERUNG



DISSERTATION
ZUR ERLANGUNG DES AKADEMISCHEN GRADES DOCTOR RERUM NATURALIUM
(DR. RER. NAT.)

VORGELEGT DEM RAT DER BIOLOGISCH-PHARMAZEUTISCHEN FAKULTÄT
DER FRIEDRICH-SCHILLER-UNIVERSITÄT JENA

VON
CORINNA HAUPT

GEBOREN AM 04.08.1976 IN BORNA

FÜR ÉTIENNE

LIFE IS NOT ONLY WHAT WE EXPERIENCE,
BUT WHAT WE REMEMBER OF IT AND HOW WE REMEMBER IT.

GABRIEL GARCÍA MÁRQUEZ

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS **5**

ZUSAMMENFASSUNG **6**

EINLEITUNG **9**

DER SCHLAGANFALL	9
<i>TYPEN DES SCHLAGANFALLS</i>	9
SCHADENSKASKADE NACH FOKALER ISCHÄMIE	10
<i>Energie- und Substratmangel im infarzierten Gehirn</i>	10
<i>Der Infarktkern</i>	11
<i>Die Penumbra</i>	12
<i>Remote</i>	14
TIERMODELLE FÜR FOKALE ISCHÄMIEN	14
ASTROZYTEN, EIN FÜR LANGE ZEIT UNTERSCHÄTZTER ZELLTYP	16
NARBENBILDUNG IM ZNS	19
GAP JUNCTIONS, CONNEXINE UND CONNEXIN 43	21
FRAGESTELLUNGENDER STUDIE	23

MATERIAL UND METHODEN **25**

INDUKTION FOKALER KORTIKALER ISCHÄMIEN MITTELS PHOTOTHROMBOSE	25
<i>Versuchstiere</i>	25
<i>Anästhesie und Temperaturkontrolle</i>	25
<i>Induktion photothrombotischer Infarkte</i>	25
MARKIERUNG TEILUNGSAKTIVER ZELLEN MITTELS BROMODESOXYURIDIN-APPLIKATION	26
IMMUNHISTOCHEMIE	27
<i>Aufarbeitung des Gewebes</i>	27
<i>Visualisierung mit Diaminobenzidin</i>	28
<i>Semiquantitative Analyse der Immunreaktivität von Connexin 43</i>	28
<i>Immunfluoreszenz für konfokale Mikroskopie/ BrdU Färbung</i>	29
<i>Bestimmung der Anzahl BrdU-positiver Astrozyten</i>	30
IN SITU HYBRIDISIERUNG	30
<i>Aufarbeitung des Gewebes</i>	30
<i>Herstellung von RNA Sonden</i>	30
<i>Vorbehandlung der Schnitte und Hybridisierung</i>	31
<i>Waschschritte, Antikörper-Inkubation und Farbentwicklung</i>	31
<i>Software gestützte Imageanalyse</i>	32
<i>In situ Hybridisierung mit gekoppelter Immunhistochemie für GFAP</i>	33
REAL TIME RT-PCR	33
<i>Isolation von Gesamt- RNA und cDNA-Synthese</i>	33
<i>Real time RT-PCR mit SYBR-Green I</i>	34
<i>Relative Quantifizierung der real time RT-PCR</i>	35

RESULTATE **36**

PHOTOTHROMBOTISCH INDUZIERTER FOKALER ISCHÄMISCHER INFARKT	36
GLIANARBENBILDUNG NACH PHOTOTHROMBOSE	36
<i>Dynamik der Glianarbe</i>	36

<i>Expression von Cx43 mRNA in der Glianarbe</i>	38
<i>Verteilung und Färbemuster von Cx43 Protein im intakten Gehirn</i>	41
<i>Expression von Cx43 Protein in der Glianarbe</i>	41
<i>Charakterisierung der Astrozyten in der Glianarbe</i>	44
CONNEXIN 43 EXPRESSION IN "REMOTE" AREALEN	46
<i>Connexin 43 mRNA Expression im somatosensorischen Kortex</i>	46
<i>Connexin 43 Protein im somatosensorischen Kortex</i>	49
<i>Connexin 43 mRNA Expression im Hippokampus</i>	50
<i>Connexin 43 Protein im Hippokampus</i>	52
 <u>DISKUSSION</u>	 54
 GLIANARBE	 54
CONNEXIN 43 EXPRESSION IN "REMOTE" AREALEN	59
<i>Connexin 43 mRNA Expression</i>	59
<i>Connexin 43 Immunreaktivität</i>	61
<i>Funktionelle Zusammenhänge</i>	63
 <u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	 67
 <u>ANHANG</u>	 77
 TABELLEN	 77
LEBENS LAUF	80
EIGENE PUBLIKATIONEN UND VORTRÄGE	82
DANKSAGUNG	84
EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG	86

Abkürzungsverzeichnis

BrdU:	5-Bromo-2'desoxy-Uridin
bp:	Basenpaare
CA:	Cornu Ammonis (Ammonshorn)
Cc:	Corpus callosum
CP:	Crossing point
Cx43:	Connexin 43
DAB:	3,3'-Diaminobenzidin
DIG:	Digoxigenin
GAPDH:	Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase
GCL:	Granule cell layer (Körnerzellschicht)
GFAP:	Glial fibrillary acidic protein (saures Gliafaserprotein)
H:	Hilus
HC:	Hippocampus
HL:	hindlimb area (Hinterpfotenareal)
HNPP:	2-hydroxy-3-naphtic acid-2'-phenylanilide phosphate
L:	Läsion
LV:	lateraler Ventrikel
MCA:	middle cerebral artery (Arteria cerebri media)
MCAO:	middle cerebral artery occlusion (Verschluss der Arteria cerebri media)
ML:	Stratum Moleculare
NMDA:	N-Methyl-D-Aspartat
O:	Stratum Oriens
Par1:	primärer somatosensorischer Kortex
Par2:	sekundärer somatosensorischer Kortex
PFA:	Paraformaldehyd
PB:	phosphate buffer
PBS:	phosphate buffered saline
PCL:	pyramidal cell layer (Pyramidenzellschicht)
PT:	Photothrombose
R/LM:	Stratum Radiatum/Lacunosum Moleculare
rtPA:	Recombinant Tissue Plasminogen Activator (rekombinanter Gewebepalminogenaktivator)
ROD:	relative optical density (Durchschnittliche optische Dichte)
SSC:	standard sodium Citrate (Trinatriumcitrat)
TBS:	Tris buffered saline

Zusammenfassung

Der Schlaganfall ist die dritthäufigste Todesursache in Deutschland. Daher ist es von entscheidender Bedeutung, die Pathophysiologie dieser Krankheit zu verstehen, um die Zahl der Schlaganfälle zu verringern und mit effektiveren Behandlungsstrategien Patienten besser helfen zu können. Ein zerebraler Infarkt kann entweder durch eine Ischämie (Unterversorgung des Hirngewebes mit sauerstoffreichem Blut) oder durch eine Blutung im Gehirn hervorgerufen werden. Verschiedene Mechanismen führen nach einer fokalen Ischämie zur sekundären Ausbreitung des Infarktkernes, zur Schädigung in entfernten Hirnregionen sowie zur Bildung einer Glianarbe. Astrozyten gehören zu den wichtigsten Komponenten der Glianarbe. Als Reaktion auf die Verletzung des Gehirns werden sie aktiviert, hypertrophieren, proliferieren und erhöhen die Expression von Intermediärfilamenten wie dem sauren Gliafaserprotein (GFAP) und Nestin. Unter physiologischen Bedingungen zeigen Astrozyten ein hohes Maß an interzellulärer Kopplung über gap junctions. Dabei spielt Connexin 43 (Cx43) eine wichtige Rolle. Unter verschiedenen pathophysiologischen Bedingungen und Erkrankungen des ZNS zeigen reaktive Astrozyten eine veränderte Expression von Cx43. Daher ergab sich die Frage, ob reaktive Astrozyten der Glianarbe nach einem fokalen ischämischen Infarkt auch eine solche Regulation erfahren und ob diese einer Dynamik unterliegt. Untersuchungen an Kulturen von neuronalen Progenitorzellen zeigten, dass Cx43 während der Entwicklung die Proliferation, Differenzierung und Migration der Progenitorzellen beeinflusste. Es stellte sich daher die Frage, ob Cx43 auch die Proliferation und Migration der an der Glianarbe beteiligten Astrozyten beeinflusst. Nach einem Schlaganfall weisen auch entfernt vom Infarktkern liegende Gebiete funktionelle und strukturelle Veränderungen sowie eine variierte mRNA- und Proteinsynthese auf. Daher stellte sich die Frage, ob die Expression von Cx43 in entfernt vom Infarktkern liegenden Arealen Veränderungen zeigt.

Um diesen Fragen nachzugehen, wurden fokale kortikale Infarkte im Hinterpfotenareal des somatosensorischen Kortex der Ratte mittels Photothrombose

ausgelöst. Die post-ischämische Expression von GFAP, Cx43 mRNA und Protein wurde am Tag 1, 3, 7, 14, 30, 60 und 120 in der Glianarbe, dem Hippokampus und dem somatosensorischen Kortex untersucht. *In situ* Hybridisierung und real time RT-PCR dienten zur Untersuchung der Cx43 mRNA Expression. Die Expression von GFAP und Cx43 Protein wurden mittels Immunhistochemie analysiert. Die Teilungsaktivität der reaktiven Astrozyten wurde via Applikation von BrdU nach Induktion der Ischämie untersucht.

Der die ischämische Läsion flankierende, zerebrale Kortex zeigte eine gleichzeitige Heraufregulation von GFAP, Cx43 mRNA und Protein. Ab Tag 14 nach Induktion der Photothrombose war ein Band aus reaktiven Astrozyten am Boden der Läsion zu beobachten, in dem die Zellen eine Heraufregulation von Cx43 mRNA und Protein zeigten. Zur gleichen Zeit war ein Zellstrom zwischen dem lateralen Ventrikel und der Läsion sichtbar, in dem Zellen auch ein erhöhtes Maß an GFAP, Cx43 mRNA und Protein Expression zeigten. Reaktive Astrozyten der Glianarbe, die die Läsion umhüllten, besonders im Band am Boden der Läsion und im Strom zwischen dem lateralen Ventrikel und der Läsion, waren nachweislich proliferativ aktiv und exprimierten das Intermediärfilament Nestin. Im somatosensorischen Kortex der ipsilateralen Hemisphäre wurde ein transients Anstieg von Cx43 mRNA-positiven Zellen von einer Reduktion in der Immunreaktivität des zugehörigen Proteins begleitet. Untersuchungen der einzelnen hippokampalen Strata zeigten ausschließlich im Stratum Oriens direkt unter der Läsion eine erhöhte Anzahl von Cx43 mRNA-positiven Astrozyten, die gleichzeitig eine Erhöhung der Immunreaktivität für Cx43 Protein und GFAP aufwiesen.

Die vorgelegte Arbeit zeigt, dass eine fokale kortikale Ischämie die Expression von Cx43 mRNA und Protein beeinflusst. Sie liefert erste Hinweise dafür, dass Cx43 an der Bildung der Glianarbe, besonders der Proliferation und Migration der reaktiven Astrozyten, beteiligt ist. Die erhöhte Anzahl von Cx43 mRNA-positiven Zellen und die gesteigerte Expression von GFAP und Cx43 Protein im Stratum Oriens des Hippokampus lassen eine Beteiligung dieses Gebietes an der Glianarbenbildung vermuten. Die beobachtete

Verringerung der Immunreaktivität für Cx43 im somatosensorischen Kortex lässt auf eine temporär gestörte interzelluläre Kommunikation schließen.

Einleitung

Der Schlaganfall

In der Rangliste der Todesursachen in Deutschland steht der Schlaganfall mit einer Inzidenz von ca. 250 000 pro Jahr an dritter Stelle (Nolte et al., 2002). Patienten, die den Infarkt überleben, sind häufig auf Grund von Lähmungen oder anderen Symptomen in ihrem täglichen Leben stark eingeschränkt oder sind dauerhaft pflegebedürftig. Medizinisch-ökonomisch gesehen ist der Schlaganfall die Krankheit, die in Deutschland die meisten Kosten für die Behandlung und vor allem für die Nachbetreuung und Pflege der Patienten verursacht. Daher ist es mehr als wichtig, die Pathophysiologie dieser Krankheit zu verstehen, um die Zahl der Schlaganfälle zu verringern und mit effektiven Behandlungsstrategien Patienten besser helfen zu können sowie Kosten für das Gesundheitssystem zu senken.

Typen des Schlaganfalls

Ein zerebraler Infarkt wird in ca. 80 % der Fälle durch eine Ischämie (Unterversorgung des Hirngewebes mit sauerstoffreichem Blut) und in ca. 20 % der Fälle durch eine Blutung hervorgerufen (Nolte et al., 2002). Ischämische Hirninfarkte werden in globale und fokale Ischämien unterteilt. Eine globale zerebrale Ischämie liegt bei einer Durchblutungsabnahme vor, die das gesamte Zentralnervensystem (ZNS) oder den größten Teil beider Hemisphären betrifft. Ursache dafür kann unter anderem ein kurzzeitiger Herz-Kreislaufstillstand sein. Fokale Hirninfarkte werden in ihrer Ätiologie unterschieden. Bei einem Verschluss größerer Hirnarterien durch einen lokal-thrombotischen Prozess (Makroangiopathie) oder durch eine arterioarterielle bzw. kardiale Embolie entsteht ein Territorialinfarkt. Verschließt sich durch eine Arteriosklerose eine Endarterie (kleine Arterie oder Arteriole) entsteht ein lakunärer Hirninfarkt (Mikroangiopathie). Da die Untersuchungen der vorgelegten Arbeit an einem Tiermodell für fokale Ischämie durchgeführt wurden, soll der Fokus der nachfolgenden Erläuterungen vorwiegend auf die Vorgänge nach solchen Infarkten gerichtet sein.

Schadenskaskade nach fokaler Ischämie

Energie- und Substratmangel im infarzierten Gehirn

Bei einem Blutfluss von $\leq 0,18$ ml/g/min (Normalwerte liegen bei 0,2-0,5 ml/g/min) verlieren einzelne Neurone aufgrund des Energie- und Substratmangels die Fähigkeit Aktionspotentiale auszubilden (Nolte et al., 2002). Die Unterversorgung mit energiereichen Substanzen kann die Zellen schädigen oder sogar zum Zelltod führen. Die nach einem fokalen Infarkt auftretenden Zellschädigungen unterliegen einer komplexen Abfolge von Schadensmechanismen (Dirnagl et al., 1999), Abb. 1). Dies wird in der räumlichen Unterteilung in Infarktkern, Penumbra und „Remote“ (entfernt vom Infarktkern liegende Gebiete) deutlich (Witte et al., 2000), die in den folgenden Abschnitten näher beleuchtet werden sollen.

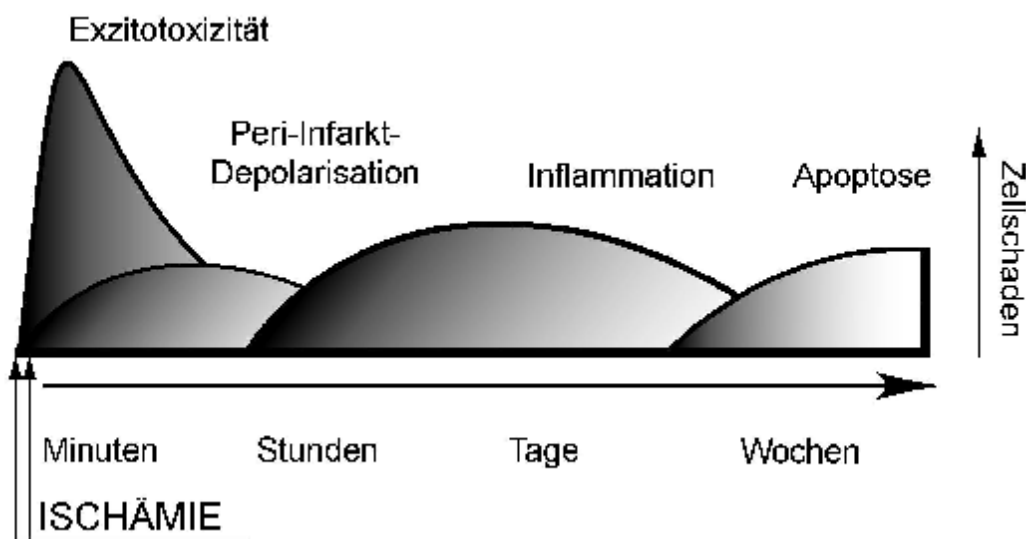


Abb. 1. Kaskade der schädigenden Mechanismen nach einer fokalen Ischämie. Unmittelbar nach Beginn der fokalen Perfusionsstörung führen exzitotoxische Mechanismen zu einer Schädigung von Neuronen und Gliazellen. Zusätzlich dazu löst die Exzitotoxizität eine Vielzahl von Ereignissen aus, die zur weiteren Schädigung des Gewebes beitragen. Dazu gehören vor allem die Peri-Infarkt-Depolarisationen und die etwas zeitversetzt eintretende Inflammation und Apoptose. (Abb. nach Dirnagl et al., 1999).

Der Infarktkern

Der Infarktkern ist das Gebiet, welches nach einer fokalen Ischämie irreversiblen strukturellen Schaden davonträgt (Witte et al., 2000). Der Blutfluss ist auf 0,1-0,15 ml/g/min herabgesetzt oder kommt ganz zum Erliegen (Nolte et al., 2002). Somit ist in diesem Gebiet die Versorgung mit Sauerstoff und energiereichen Substanzen sehr stark herabgesetzt. Als unmittelbare Folge daraus versagen die energieabhängigen Ionenpumpen, die den Gradienten zwischen Intra- und Extrazellulärraum aufrechterhalten. Das Membranpotential bricht zusammen und die Zellen unterliegen der anoxischen Depolarisation. Im Extrazellulärraum steigt die Kaliumkonzentration während die Natrium- und Kalziumkonzentrationen sinken (Witte et al., 2000). Als Folge daraus nehmen die Zellen vermehrt Wasser auf und schwellen an, was zu einer Verkleinerung des Extrazellulärspaces führt (Dirnagl et al., 1999). Sowohl die mRNA- als auch die Proteinsynthese sind erheblich gestört und die Reserven an ATP gehen zu Ende. Der Transport des exzitatorischen Neurotransmitters Glutamat ist invertiert und Glutamat wird zusätzlich von Gliazellen in den Extrazellulärraum abgegeben (Lin et al., 1998). Folglich kommt es zur massiven Anreicherung von Glutamat im Extrazellulärraum. Dieser erhöhte Glutamatspiegel führt dazu, dass der glutamaterge NMDA-Rezeptor vermehrt Kalziumionen in die Postsynapse einfließen lässt. Der daraus resultierende erhöhte Kalziumspiegel löst eine Vielzahl für die Zelle schädliche Ereignisse aus (vermehrte Radikalbildung, Brüche in der DNA...), die schließlich zum Absterben des Neurons führen. Die durch Glutamat vermittelte Zerstörung von Nervenzellen wird auch als Exzitotoxizität bezeichnet.

Auf Grund dieser Anhäufung zellschädigender Mechanismen nach einer fokalen Ischämie kommt es zum Untergang sowohl von Neuronen als auch Gliazellen im Infarktkern.

Die Penumbra

Die Penumbra ist das den Infarktkern umgebende Gebiet, in dem der Blutfluss herabgesetzt ist, wobei der Energiehaushalt aber noch aufrechterhalten werden kann (Hossmann, 1994; Witte et al., 2000). Durch den verminderten Blutfluss wird eine sehr komplexe Schadenskaskade, der Mechanismen wie Exzitotoxizität, Inflammation, Apoptose und Peri-Infarkt-Depolarisationen zu Grunde liegen, ausgelöst (Dirnagl et al., 1999, Abb. 1).

Aus medizinischer Sicht ist die Penumbra das Gebiet im infarzierten Gehirn, in dem mit gezielter Therapie Zellen vor dem Untergang gerettet werden können und somit eine sekundäre Ausbreitung des Infarktkernes verhindert werden kann. Die momentan einzige Therapiemöglichkeit stellt die Thrombolyse dar (Davalos, 2005). Dabei wird mittels intravenöser Gabe von rtPA (Recombinant Tissue Plasminogen Activator) das körpereigene Plasminogen aktiviert, welches das Fibrinnetz des Thrombus angreift und auflöst. Allerdings hat sich in klinischen Studien gezeigt, dass diese Methode nur in einem Zeitfenster von ca. 3 h anwendbar ist (Davalos, 2005; Nolte et al., 2002). Wird die Thrombolyse nach diesem Zeitraum angewandt, steigt die Gefahr von Hirnblutungen, welche wiederum einen neuen Infarkt auslösen können (Nolte et al., 2002).

Innerhalb der ersten 6 bis 8 h nach Beginn der Ischämie treten in der Penumbra wiederholte Peri-Infarkt-Depolarisationen auf, die sich, wie im Tiermodell gezeigt werden konnte, über den gesamten ipsilateralen Kortex ausbreiten (Schroeter et al., 1995). Beim Menschen konnten Peri-Infarkt-Depolarisationen bis jetzt nur nach traumatischen Hirnverletzungen gezeigt werden (Fabricius et al., 2006). Die Charakteristika dieses Phänomens sind eine Negativierung der kortikalen Gleichspannung sowie eine Erniedrigung der EEG-Amplitude (Röther, 2000). Ausgelöst werden diese Depolarisationen durch den Überschuss an Kalium, während die Propagation über den glutamatergen NMDA-Rezeptor vermittelt wird (Lauritzen and Hansen, 1992). Diese wiederholten Depolarisationen mit anschließenden Repolarisationen bedeuten für die Zellen massiven Stress und sind eine Ursache dafür, dass zunehmend Gewebe der

Penumbra in den Infarktkern rekrutiert wird und sich somit der Kern sekundär vergrößert (Witte and Stoll, 1997).

Eine fokale Ischämie löst außerdem eine Entzündungsreaktion aus, die sowohl den Infarktkern als auch das umliegende Gewebe erfasst. Auch in weiter entfernten Gebieten innerhalb der geschädigten Hemisphäre können transient Entzündungsmarker nachgewiesen werden (Schroeter et al., 1999). Der Sauerstoffmangel, die Bildung freier Radikale und viele weitere Faktoren führen zur Expression von pro-inflammatorischen Genen, deren zugehörige Proteine eine komplexe Entzündungsreaktion auslösen. Die Aktivierung von residenten immunkompetenten Mikroglia ist schon wenige Stunden nach dem Infarkt zu beobachten (Schroeter et al., 1994; Schroeter et al., 1999). Nach Aktivierung durchlaufen Mikrogliazellen morphologische Veränderungen, exprimieren veränderte Oberflächenmoleküle und sind immunzytochemisch von hämatogenen Makrophagen nicht mehr zu unterscheiden. Wie im Tierversuch gezeigt werden konnte, infiltrieren Letztere aber erst Tage später den infarzierten Bereich (Schroeter et al., 1997). Beide Zelltypen, aktivierte Mikroglia und hämatogene Makrophagen, sind in der Lage, zu Phagozyten zu transformieren. Wenige Tage nach dem ischämischen Infarkt sind auch T-Zellen im Bereich des Infarkts vorzufinden (Jander et al., 1995). Ebenso wie die Mikroglia werden auch Astrozyten nach einer Ischämie aktiviert, durchlaufen einen morphologischen Wandel und verändern die Expression ihrer Oberflächenmoleküle. Die Details der Astrozytenaktivierung werden im Zusammenhang mit der Narbenbildung im Gehirn näher erläutert.

Hirnzellen, die der exzessiven Aktivierung der Glutamatrezeptoren, dem erhöhten intrazellulären Kalziumspiegel sowie großen Mengen an freien Radikalen ausgesetzt sind, werden dadurch häufig so stark geschädigt, dass sie absterben. Das kann zum einen ein nekrotischer (vor allem im Infarktkern) oder ein apoptotischer Tod sein. Im Randgebiet von ischämisch geschädigtem Gewebe ist Tage bis Wochen nach dem Infarkt ein selektiver Tod von Neuronen zu beobachten, der dem Anschein nach einem apoptotischen Mechanismus folgt, wie im Tiermodell gezeigt werden konnte (Braun et al.,

1996; Manev et al., 1994). Dieser verzögerte Zelltod wird mit der oben beschriebenen Entzündungsreaktion in Verbindung gebracht. Die Zellen der Entzündungskaskade setzen große Mengen an Zytokinen frei, welche in der Lage sind, Apoptose auszulösen (Witte and Stoll, 1997).

Remote

Nach einem Schlaganfall weisen auch entfernt vom eigentlichen Infarkt liegende Gebiete funktionelle und strukturelle Veränderungen auf. Hervorgerufen werden diese Veränderungen vor allem durch Ödembildung und die Peri-Infarkt-Depolarisationen (Bidmon et al., 1997; Witte et al., 2000). Wenige Stunden nach der Infarzierung ist eine vermehrte Wasseraufnahme ins Hirngewebe zu verzeichnen, was zum Anschwellen der Zellen führt. Das anschwellende Gewebe übt auf umliegendes, ungeschädigtes Gewebe Druck aus, was wiederum eine Kompression und unter Umständen eine ischämische Schädigung (Sekundärinfarkt) dieser Hirnbereiche herbeiführt (Dirnagl et al., 1999). Die Ödembildung ist eine der primären Todesursachen nach einem Schlaganfall. Mit Hilfe einer Trepanation des Schädels kann dieser sekundäre Schaden weitgehend eingegrenzt werden (Witte et al., 2000). Wie in Tiermodellen für fokale Ischämien gezeigt werden konnte, führt der durch Peri-Infarkt-Depolarisationen ausgelöste metabolische Stress zu veränderter mRNA- und Proteinsynthese wovon verschiedenste Signalkaskaden betroffen sind (Comelli et al., 1992; Dietrich et al., 2000; Gass et al., 1992).

Tiermodelle für fokale Ischämien

Das Ziel der Tiermodelle für Ischämie ist es, die Zufuhr von Sauerstoff und Glukose zum Gehirn zu reduzieren und so den Zustand während eines Schlaganfalls nachzuahmen (Traystman, 2003). Die verwendeten Tiermodelle können somit nur Teilaspekte der Pathophysiologie menschlicher Schlaganfälle wiedergeben, da der menschliche Hirninfarkt ätiopathogenetisch sehr heterogen ist. Die Unvollkommenheit der Tiermodelle kann einerseits nachteilig sein, vor allem wenn es um die Wirksamkeit von Medikamenten geht, kann aber auch als Vorteil gesehen werden. Zur Aufklärung spezifischer

Mechanismen, um mögliche Angriffspunkte für Therapien zu finden, erweist sich die Unvollkommenheit als nützlich.

Ein häufig angewendetes Tiermodell ist der Verschluss der Arteria cerebri media (MCAO), was zu einem Infarkt in Striatum und zerebralen Kortex führt (Traystman, 2003). Das Ausmaß und die genaue Lokalisation des Infarktkernes hängen von der Dauer des Gefäßverschlusses, der Art und dem genauen Punkt (proximale oder distale Arteria cerebri media, MCA) des Verschlusses sowie dem kollateralen Blutfluss ab (Traystman, 2003). Die MCAO wird als das Modell angesehen, das die Charakteristika der häufigsten Formen der fokalen Ischämie beim Menschen am besten repräsentiert. Daher werden diese Modelle oft für pharmakologische Studien oder zur Charakterisierung von Schlaganfallassozierten Genen und Proteinen eingesetzt (Traystman, 2003). Ein erheblicher Nachteil der MCAO ist die den methodischen und tierindividuellen Schwankungen unterliegende Variabilität der Infarktausprägung und Lokalisation, die die Vergleichbarkeit der Ergebnisse erschwert.

Für einige Untersuchungen hat sich das Modell des photothrombotisch induzierten Schlaganfalls (Watson et al., 1985) als vorteilhaft erwiesen. Bei diesem Modell wird der photosensitive Farbstoff Bengal Rosa bei gleichzeitiger Belichtung einer spezifischen Stelle der Kalotte appliziert. Die so erzeugten Infarkte beschränken sich auf den zerebralen Kortex und belassen tiefer gelegene Hirnstrukturen strukturell unversehrt (Witte and Stoll, 1997). Die Vorteile dieses Modells sind in der guten Reproduzierbarkeit bezüglich Lokalisation und Größe des Infarktes zu sehen, was den Vergleich von Ergebnissen erheblich erleichtert. Als nachteilig erweist sich allerdings die sehr schmale Penumbra (ca. 500 µm im Rattegehirn, Witte, 1998). Da in der hier vorgelegten Studie die Cx43 Expression im Verlauf der Glianarbenbildung sowie im umliegenden (remote) Gewebe analysiert werden sollte, wurde dieses Modell für die Untersuchungen gewählt. Es gewährleistet die benötigte hohe Reproduzierbarkeit der erzeugten ischämischen Läsionen und gibt somit zuverlässige Aussagen bezüglich der Expression von Cx43 in den untersuchten Arealen.

Astrozyten, ein für lange Zeit unterschätzter Zelltyp

Astrozyten gehören zur Gruppe der Makroglia. Protoplasmatische Astrozyten sind in der grauen Hirnsubstanz zu finden. Ihre zahlreichen Fortsätze breiten sich sternförmig um das Soma aus und weisen sehr viele Verzweigungen auf (Abb. 2A). Jeder protoplasmatische Astrozyt hat sein eigenes Territorium was nur zu einem sehr geringen Grad mit dem Territorium der benachbarten Astrozyten überlappt (Nedergaard et al., 2003, Abb. 2C, D). Fibröse Astrozyten sind vorwiegend in der weißen Substanz anzutreffen, daher findet man ihre Somata oft in Reihen zwischen Axonbündeln angeordnet. Die Fortsätze der fibrösen Astrozyten sind häufig parallel zu den Axonen im Faserbündel ausgerichtet.

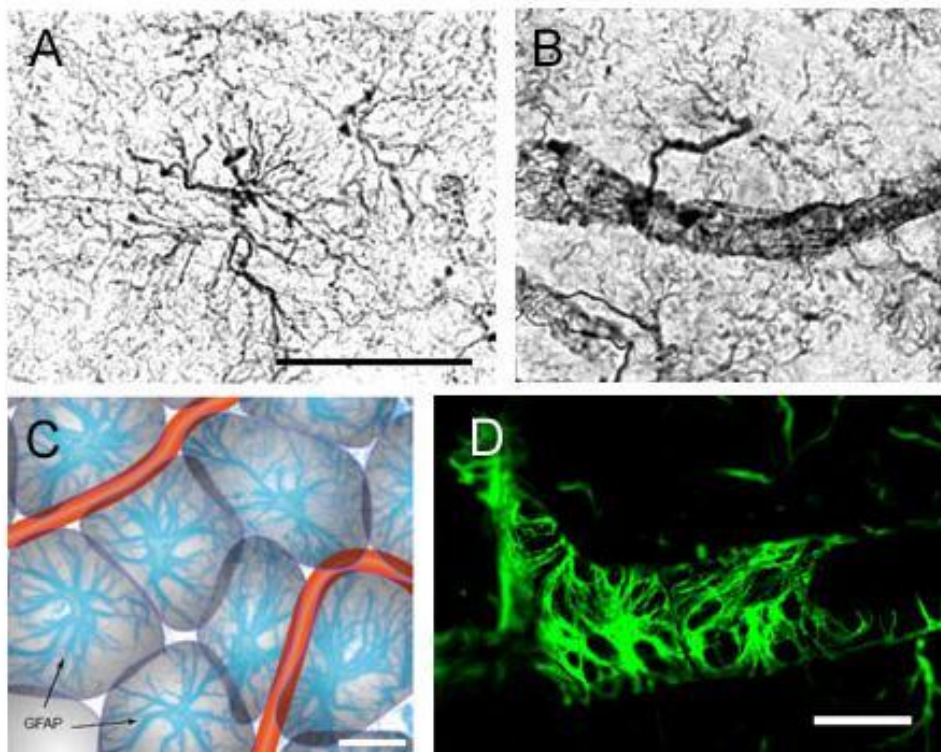


Abb. 2. **A:** GFAP gefärbter protoplasmatischer Astrozyt im zerebralen Kortex in der typischen Sternform. **B:** Astrozyt, der mit einem dicken Fortsatz ein Blutgefäß kontaktiert. **C:** Schematische Darstellung der Organisation von Astrozyten in Bezug auf Überlappung der Areale und Kontakte mit Blutgefäßen. Es wird deutlich, dass die typische Sternform, wie sie nach z.B. GFAP-Färbungen sichtbar wird, nicht die wahre Natur der Astrozyten widerspiegelt. Zieht man auch die sehr kleinen, GFAP-negativen Fortsätze in Betracht, haben Astrozyten eine eher runde Form (in der Grafik soll dies durch die grauen „Blasen“ um die GFAP-positive Gestalt verdeutlicht werden). **D:** GFAP positive (grün) Fortsätze an einem Gefäß (Längsschnitt). Die Grenze der Territorien der einzelnen Astrozyten wird in dieser Abbildung besonders deutlich. Abb. A, B und D sind Aufnahmen von eigenen Färbungen. Abb. C ist aus Nedergaard et al., 2003. Maßbalken: 50 µm (A und B), 20 µm (D).

Lange Zeit wurde den Astrozyten nur eine untergeordnete Funktion im Nervengewebe zuerkannt. Dies spiegelt sich vor allem in der Bezeichnung „Gliazelle“ wider. Das Wort Glia stammt vom griechischen Wort *gliok* ab, welches üblicherweise mit *Leim* übersetzt wird. Entgegen der Meinung, dass Astrozyten nur eine unterstützende Funktion haben, weiß man heute, dass ihre Funktion weitaus umfassender ist.

Phylogenetisch betrachtet, nimmt das Verhältnis von Neuronen zu Astrozyten zu Gunsten der Astrozyten zu. Während in *Caenorhabditis elegans* auf 6 Neurone ein Astrozyt kommt, liegt das Verhältnis Neuron : Astrozyt in Nagern bei 3:1 und das menschliche Gehirn wird sogar von Astrozyten dominiert (durchschnittlich 1,4 Astrozyten pro Neuron; Bass et al., 1971; Nedergaard et al., 2003). Es stellt sich daher die Frage, warum sich das Verhältnis Neurone zu Astrozyten im Laufe der Evolution in diese Richtung entwickelt hat. Relativ plausibel erscheint es, dass die zunehmende Komplexität des neuronalen Netzwerkes ein höheres Maß an Modulationsmöglichkeiten und Kontrolle erfordert. Für die Funktion des Modulators und Kontrolleurs scheinen Astrozyten bestens geeignet zu sein. Wie eingangs schon erwähnt, zeichnen sich Astrozyten morphologisch durch stark verzweigte Fortsätze aus, die ein relativ großes Areal abdecken. Auf diese Art haben die Astrozyten die Möglichkeit, Neurone zu „umgarnen“ und gezielt Signale abzugeben, die, wie bereits gezeigt werden konnte, modulatorisch auf Synapsen wirken (Haydon, 2001; Kang et al., 1998; Newman, 2003). Außerdem scheinen Astrozyten einen Einfluss auf die Synaptogenese zu haben. Neurone, die mit Astrozyten co-kultiviert wurden, haben siebenmal mehr Synapsen ausgebildet als in reinen Neuronenkulturen (Ullian et al., 2001). Adulte Astrozyten haben außerdem das Potential, Neurogenese zu induzieren (Song et al., 2002). Astrozyten sind also in der Lage, die mitotische Generierung von Neuronen, die Ausbildung des synaptischen Netzwerkes und die synaptische Aktivität zu regulieren.

Astrozyten können keine Aktionspotentiale generieren, auf elektrische Erregung reagieren sie nur mit einer passiven Änderung des Membranpotentials. Dennoch scheinen Astrozyten miteinander zu kommunizieren. Es konnte gezeigt werden, dass

nach Applikation von Glutamat der zytosolische Kalziumgehalt kurzzeitig anstieg und als Welle erhöhten Kalziums inter-astrozytär propagiert wurde (Cornell-Bell et al., 1990). Angrenzende Neurone reagieren auf diese innerhalb einer Astrozytenpopulation propagierten Kalziumwelle selbst mit der Erhöhung ihres intrazellulären Kalziumspiegels (Nedergaard, 1994). Aufgrund des momentanen Wissensstandes muss den Astrozyten eine durchaus aktive Rolle in der Prozessierung von Informationen im Gehirn zuerkannt werden.

Astrozyten umhüllen die Blutgefäße mit ihren zahlreichen Fortsätzen (Abb. 2B, C und D). Welche Funktion ihnen dabei bezüglich der Blut-Hirn-Schranke zukommt, ist noch unklar. Vermutlich haben sie aber auch an dieser Stelle eine modulatorische Funktion. In Kultur konnte gezeigt werden, dass Astrozyten Faktoren freisetzen, die die Bildung der tight junctions in Endothelzellen fördern (Abbott, 2002; Abbott et al., 2006). Die enge Verbindung zwischen Gefäßsystem und Astrozyten zeigt schon aus rein anatomischen Gründen, dass Glukose nur über Astrozyten zu Neuronen gelangen kann. Ein möglicher Mechanismus wäre die Aufnahme von Glukose über spezielle Transporter (Astrozyten exprimieren verschiedene Glukosetransporter), deren Umwandlung in Laktat und dessen Abgabe an Neurone nach dem Bedarfsprinzip (Tsacopoulos and Magistretti, 1996). Es gibt außerdem Hinweise dafür, dass Astrozyten an der aktivitätsabhängigen Regulation des lokalen Blutflusses beteiligt sind (Zonta et al., 2003).

Eine weitere wichtige Aufgabe der Astrozyten ist die Aufrechterhaltung der Homeostase des Extrazellulärspaces. Astrozyten sind z.B. in der Lage, das von Neuronen freigesetzte Kalium aufzunehmen und über das Zytoplasma miteinander verbundener Astrozyten umzuverteilen (Chen and Swanson, 2003; Nagy and Rash, 2000). Dieser Vorgang wird als „spatial buffering“ bezeichnet und setzt voraus, dass die Zellen über so genannte gap junctions miteinander gekoppelt sind. Da die gap junctions und deren molekulare Bausteine, die Connexine, speziell das astrozytäre Cx43 in der vorgelegten Arbeit eine wichtige Rolle spielen, soll dieser Sachverhalt in einem separaten Abschnitt näher beleuchtet werden. Über verschiedene Mechanismen tragen Astrozyten

außerdem zur Regulation des pH-Wertes im Extrazellulärraum bei (Coles and Deitmer, 2005). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Astrozyten auch an der Kalziumhomeostase beteiligt sind und den Neurotransmitter Glutamat aufnehmen können (Blanc et al., 1998; Rao et al., 2001; Rosenberg, 1991; Rothstein et al., 1996). Die Aufrechterhaltung der extrazellulären Homeostase ist die Voraussetzung für die Funktionsfähigkeit des neuronalen Netzwerkes unter physiologischen Gegebenheiten. Die Wiederherstellung der Homeostase unter pathologischen Bedingungen ist notwendig, um Zellen vor dem Untergang zu retten.

Astrozyten sind also multifunktionelle „housekeeping“-Zellen, durch deren Funktion es Neuronen aus phylogenetischer Sicht möglich war, sich ausschließlich auf die Prozessierung, Verschlüsselung und Weiterleitung von Information zu spezialisieren.

Narbenbildung im ZNS

Eine Verletzung des ZNS führt, wie bei allen anderen Organen des Körpers auch, zu einer Narbenbildung im betroffenen Bereich. Die Verletzungen können dabei sowohl mechanischen Ursprungs sein als auch durch pathophysiologische Ereignisse (z.B. ischämische Infarkte) hervorgerufen werden. Eine Narbenbildung wird auch im Zusammenhang mit neurologischen Erkrankungen wie Epilepsie, Multipler Sklerose und der Alzheimer Erkrankung beobachtet (Aronica et al., 2001; Monnerie et al., 2005; Schroeter et al., 1995; Sohl et al., 2000; Stichel et al., 1999). Am komplexen Vorgang der Narbenbildung sind sowohl mesodermale Zellen (Fibroblasten, Endothelzellen) als auch Gliazellen (Astrozyten, Microglia) beteiligt. Unmittelbar nach einer Verletzung durchlaufen Gliazellen in der Umgebung morphologische und funktionelle Veränderungen, die unter anderem die erhöhte oder *de novo* Synthese und Freisetzung von löslichen Faktoren (Wachstumsfaktoren, Cytokine, Proteasen) nach sich zieht (Ridet et al., 1997; Stichel and Muller, 1998). Aufgrund dieses Wandels erfolgt auch eine Veränderung der Zusammensetzung der extrazellulären Matrix. Obwohl verschiedene Gliazelltypen an der

Narbenbildung beteiligt sind, spielen die Astrozyten die vorherrschende Rolle (Stichel and Muller, 1998). Astroglia reagieren auf Verletzungen mit gesteigerter metabolischer Aktivität, Hypertrophie und der Erhöhung von intermediären Filamenten wie dem sauren Gliafaserprotein (glial fibrillary acidic protein, GFAP), Nestin und Vimentin. In diesem Zustand werden die Astrozyten als „reaktiv“ bezeichnet. Die erhöhte Expression der intermediären Filamente, insbesondere GFAP, dient als Marker für die Aktivierung der Astrozyten (Ridet et al., 1997). Nach verschiedenen Verletzungen im Gehirn konnte gezeigt werden, dass reaktive Astrozyten auch teilungsaktiv sind (Lee et al., 2003; Liu and Chen, 1994; Norenberg, 2005). Die Ansammlung reaktiver Astrozyten im Verletzungsbereich wird in der Literatur als reaktive Gliose, Astrogliose oder Glianarbe bezeichnet. Grundsätzlich unterscheidet man zwei verschiedene Ausprägungen der Gliose (Ridet et al., 1997). Zum einen führt die Aktivierung der Astrozyten in unmittelbarer Läsionsumgebung zu einer Narbenbildung, die die Gewebestruktur bleibend verändert (anisomorphe Gliose). Zum anderen findet man distal der Verletzung eine Form der astroglialen Aktivierung, die die bestehenden Gewebestrukturen respektiert und nicht durch Narbengewebe ersetzt (isomorphe Gliose; Fernaud-Espinosa et al., 1993). Die Art und Ausprägung der astrozytären Aktivierung ist sehr stark vom Verletzungstyp und der betroffenen Struktur des ZNS abhängig.

Die Ausbildung einer Glianarbe ist zweiseitig. Einerseits grenzt das Narbengewebe verletzte Bereiche, in denen vorwiegend nekrotische und apoptotisch Zellen vorkommen, gegenüber intakten Hirnregionen ab und verhindert somit eine Ausweitung der Verletzung. Andererseits stellt es gleichzeitig eine sowohl mechanische als auch chemische Barriere für axonale Sprossung dar (Stichel et al., 1999). Allerdings konnte auch gezeigt werden, dass die an der Narbenbildung beteiligten Zellen Moleküle (Zytokine, Wachstumsfaktoren, Adhesionsmoleküle und extrazelluläre Matrix Moleküle) freisetzen, welche die Axogenese, Synaptogenese und Neurogenese fördern können (Dirnagl and Priller, 2005; Panickar and Norenberg, 2005; Stichel et al., 1999).

Gap junctions, Connexine und Connexin 43

Gap junctions sind die anatomische Grundlage für die elektrische Kommunikation zwischen Zellen. Außer den dafür notwendigen Ionen können über gap junction Kanäle auch Metabolite, second messenger Moleküle inbegriffen, mit einer Größe bis zu 1 kDA zwischen Zellen ausgetauscht werden (Dermietzel and Hofstadter, 1998; Dermietzel and Spray, 1993). Zellen, die über gap junctions miteinander verbunden sind, stellen eine Einheit dar, die man funktionelles Synzytium nennt. Das wohl beeindruckendste Beispiel ist die Vernetzung der Myozyten im Herz (Beyer et al., 1987), aber auch im ZNS ist die Kommunikation von Zellen über gap junctions unabdingbar. Die molekularen Bausteine der gap junction Kanäle sind die Connexine. Sechs transmembranale Connexinmoleküle bilden einen Hemi-Kanal, der mit einem weiteren Hemikanal in einer angrenzenden Zellmembran einen gap junction Kanal bilden kann (Zahs et al., 2003, Abb. 3). Dies kann sowohl zwischen Membranabschnitten derselben Zelle als auch mit benachbarten Zellen stattfinden. In der Maus konnten bisher 20 Gene identifiziert werden, die für Connexine

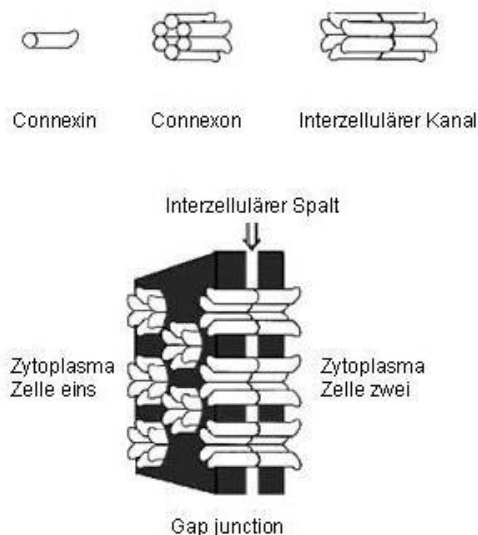


Abb. 3. Organisation von Connexinen zu Connexon (Hemikanal) und interzellulärem Kanal. Gap junctions sind Ansammlungen von mehreren interzellulären Kanälen. Die Kanäle überbrücken den etwa 3 nm breiten interzellulären Spalt und verbinden somit das Zytoplasma von Zelle eins mit dem Zytoplasma der Zelle zwei. Nach einer Abb. aus Simon and Goodenough, 1998.

kodieren (Goodenough and Paul, 2003). Die Nomenklatur der Connexine bezieht sich auf das Molekulargewicht der zugehörigen Proteine (Beyer et al., 1987).

In Astrozyten werden gap junctions durch Connexin 43, Connexin 30 und Connexin 26 gebildet, wobei Cx43 in vielen Hirnbereichen dominiert (Nagy et al., 2004; Rash et al., 2001a; Rash et al., 2001b). Connexin 43 scheint im Gehirn ausschließlich in

den Astrozyten exprimiert zu werden (Rash et al., 2000), auf den gesamten Organismus bezogen ist es ubiquitär in fast allen Organen und Geweben anzutreffen (Dermietzel and Spray, 1993).

Während der Hirnentwicklung spielt Cx43 eine Rolle bei der Proliferation, Migration und Differenzierung von Zellen. Dies konnte an Kulturen von neuronalen Progenitorzellen gezeigt werden (Cheng et al., 2004; Duval et al., 2002; Scemes et al., 2003). Auch unter pathophysiologischen Bedingungen scheint Cx43 auch eine wichtige Funktion zu haben. So konnte gezeigt werden, dass Cx43 eine Toleranz gegenüber ischämischen Stress vermittelt (Lin et al., 2003; Nakase et al., 2003a; Nakase et al., 2003b; Nakase et al., 2004; Naus et al., 2001). Desweiteren haben Untersuchungen an malignen Gliomen gezeigt, dass für das aggressive Wachstum und die invasive Verbreitung Cx43 von Bedeutung ist (Lin et al., 2002). Allerdings sind nicht alle Cx43 vermittelte Prozesse an eine funktionelle Kopplung gebunden. Während die Kopplung der Zellen über Cx43 bei der Proliferation neuraler Vorläuferzellen notwendig ist (Cheng et al., 2004, Duval et al., 2002), ist die zellschützende Wirkung zwar an die Integration der Moleküle in die Zellmembran gebunden, wird aber auch bei nicht vorhandener Kopplung der Kanäle realisiert (Lin et al., 2003). Die invasive Wanderung maligner Gliome setzt eine Kopplung voraus, während die Adhäsion und zelluläre Aggregation der Gliomzellen unabhängig von einer Kopplung über Cx43 stattfindet (Lin et al., 2002).

Die Kopplung von Astrozyten wird pathophysiologisch, vor allem im Bezug auf die oben erläuterte Narbenbildung, kontrovers diskutiert. Da die Narbe die Grenze zwischen geschädigtem und gesundem Gewebe darstellt, wird eine funktionelle Kopplung dieser Bereiche für den so genannten „kiss of death“ (sekundäre Gewebsschädigung durch apoptotische Prozesse) verantwortlich gemacht (Fonseca et al., 2002; Frantseva et al., 2002a; Lin et al., 1998; Rami et al., 2001). Diese Theorie wird durch pharmakologische Untersuchungen gestützt. So führte z.B. die Blockierung von gap junctions mit Octanol zu einem signifikant kleinerem Infarktvolumen nach Ischämie (Rawanduzy et al., 1997). Andere Untersuchungen stützen dagegen den „good samaritan effect“ der funktionellen

Kopplung von Astrozyten. So konnte z.B. gezeigt werden, dass die Stresstoleranz von Zellen erhöht war, wenn eine Kopplung der Zellen vorlag (Blanc et al., 1998; Lin et al., 2003). Untersuchungen an transgenen Mäusen bestätigen diese Theorie. Mäuse mit Cx43 defizienten Astrozyten zeigten nach einer fokalen Ischämie ein vergrößertes Infarktvolumen sowie gesteigerte Inflammation und Apoptose (Nakase et al., 2004).

Fragestellungen der Studie

Mechanische Verletzungen, pathophysiologische Ereignisse und neurologische Erkrankungen des Gehirns führen zu einer Narbenbildung (Aronica et al., 2001; Monnerie et al., 2005; Schroeter et al., 1995; Sohl et al., 2000; Stichel et al., 1999). Reaktive Astrozyten sind wichtige Komponenten einer solchen Narbe (Stichel and Muller, 1998). Unter verschiedenen pathophysiologischen Bedingungen und Erkrankungen des ZNS zeigten reaktive Astrozyten eine veränderte Expression von Cx43 (Aronica et al., 2001; Fonseca et al., 2002; Hossain et al., 1994b; Naus et al., 1991; Rohlmann et al., 1993). Daraus ergab sich die Hypothese, dass die Expression von Cx43 in reaktiven Astrozyten der Glianarbe nach einem fokalen ischämischen Infarkt verändert ist. Methodisch wurde dieser Hypothese am Modell der Photothrombose, die zu einer kompakten und räumlich begrenzten Glianarbe führt, nachgegangen. Die Expression von Cx43 mRNA wurde mittels *in situ* Hybridisierung und real time RT-PCR untersucht, die des Proteins mit Immunhistochemie. Ob diese Regulation einer Dynamik unterliegt, wurde anhand einer Zeitreihe von Tag 1 bis Tag 120 nach Induktion der Ischämie analysiert.

In der Literatur ist beschrieben, dass reaktive Astrozyten in der näheren Umgebung einer Hirnverletzung teilungsaktiv sind (Lee et al., 2003; Liu and Chen, 1994; Norenberg, 2005). Daraus ergab sich die Hypothese, dass reaktive Astrozyten der Glianarbe nach einer fokalen Ischämie proliferativ aktiv sind. Um dieser Hypothese nachzugehen, wurde Tieren nach Induktion der Ischämie das Thymidin-Analogon BrdU appliziert. Teilungsaktive Astrozyten wurden mittels Co-Lokalisation von BrdU und S100 β (einem astrozytären Marker) identifiziert.

Untersuchungen an Kulturen von neuronalen Progenitorzellen zeigten, dass Cx43 während der Entwicklung die Proliferation, Differenzierung und Migration der Progenitorzellen beeinflusste (Cheng et al., 2004; Duval et al., 2002; Scemes et al., 2003). Aus diesem Literaturbefund ergab sich die Hypothese, dass Cx43 auch die Proliferation und Migration der an der Gliaarbe beteiligten Astrozyten beeinflusst. Um dem nachzugehen, wurden in einem ersten Schritt die ab Tag 14 nach Induktion der Ischämie nachgewiesenen reaktiven Astrozyten am Boden der ischämischen Läsion und im Strom zwischen dem lateralen Ventrikel und der Läsion auf die Expression von Cx43 und die Teilungsaktivität untersucht.

Nach einem Schlaganfall weisen auch entfernt vom Infarktkern liegende Gebiete funktionelle und strukturelle Veränderungen auf. Hervorgerufen werden diese Veränderungen vor allem durch Ödembildung und Peri-Infarkt-Depolarisationen (Witte et al., 2000). Wie in Tiermodellen für fokale Ischämien gezeigt werden konnte, führte der durch Peri-Infarkt-Depolarisationen ausgelöste metabolische Stress zu veränderter mRNA- und Proteinsynthese (Comelli et al., 1992; Dietrich et al., 2000; Gass et al., 1992). Daraus ergab sich die Hypothese, dass die Expression von Cx43 auch in entfernt vom Infarktkern liegenden Arealen Veränderungen unterliegt. Im Hinblick darauf wurde die Expression von Cx43 im primären und sekundären somatosensorischen Kortex sowie im Hippokampus mittels *in situ* Hybridisierung, real time RT-PCR und Immunhistochemie analysiert. Ob diese Regulation eine zeitliche Dynamik aufweist, wurde in einer Zeitreihe von Tag 1 bis Tag 120 nach Induktion der Ischämie untersucht.

Material und Methoden

Induktion fokaler kortikaler Ischämien mittels Photothrombose

Versuchstiere

Die Versuche wurden an adulten männlichen Wistar-Ratten mit einem Körpergewicht von 270-300 g durchgeführt. Die Tiere entstammten der Eigenzucht der Tierversuchsanlage, in der sie spezifisch pathogenfrei unter folgenden konstanten Bedingungen gehalten wurden: 22-24 °C Raumtemperatur, 60-80 % relative Luftfeuchtigkeit bei einem Tag-Nacht-Rhythmus von je 12 h. Das Futter, welches aus Altromin (pelletiertes Trockenfutter) und angesäuertem Wasser bestand, war den Tieren *ad libitum* zugänglich.

Anästhesie und Temperaturkontrolle

Die Eingriffe zur Induktion der Photothrombose wurden unter Vollnarkose durchgeführt. Zur Einleitung der Narkose wurden die Tiere zunächst in einen Glaszylinder gesetzt, der mit einem Gasgemisch aus Lachgas (N₂O) und Sauerstoff (O₂) im Verhältnis 2:1 und 2,5 % (V/V) Isofluran geflutet war. Danach wurden die Tiere mit einer Inhalationsmaske versehen und an den hinteren Extremitäten fixiert. Während des gesamten Eingriffes wurde der Isoflurananteil im Inhalationsmedium auf 2,5 % gehalten. Die Kontrolle der Körpertemperatur erfolgte mit einem elektronischen Thermofühler über den eine Heizdecke bzw. Heizwanne reguliert wurde. Nach Beendigung des Eingriffes wurden die Tiere zum Aufwachen in einen separaten Käfig gelegt.

Induktion photothrombotischer Infarkte

Als Modell zur Induktion ischämischer Infarkte diente die Photothrombose (Watson et al., 1985). Die Versuchstiere wurden, wie beschrieben, anästhesiert und in Narkose gehalten. Im linken Leistenbereich wurde die Femoralvene freipräpariert und ein Katheter eingeführt. Danach wurden die Tiere abdominal in einer Heizwanne gelagert und der Kopf in einem stereotaktischen Rahmen fixiert. Anschließend wurde die Kopfhaut mit einem Skalpell geöffnet und die Kalotte freipräpariert. Der Mittelpunkt zwischen Bregma und

Lambda wurde stereotaktisch ermittelt (Abb. 4A) und die punktförmige Kaltlichtquelle (KL 1500, Schott, Deutschland, Durchmesser 1,5 mm) wurde 4 mm lateral vom ermittelten Mittelpunkt auf die Kalotte aufgesetzt. Während der ersten Minute der Belichtung wurde der fotosensitive Farbstoff Bengal Rosa (Dinatriumsalz des 3,4,5,6,-Tetrachloro-2',4',5',7'-tetrajodofluorescein, 1,3 mg/100 mg Körpergewicht, 10 mg/ml in 0.9 %iger NaCl-Lösung) über den Femoralkatheter injiziert (Abb. 4A). Die Belichtungszeit betrug 20 min. Durch Lichteinwirkung auf das Bengal Rosa kommt es zu einer Freisetzung von Sauerstoffradikalen, die wiederum zu einer Endothelschädigung und einer daraus resultierenden Thrombozytenaggregation führt. Der Blutfluss wird in den betroffenen Gefäßen dauerhaft behindert, wodurch eine irreversible ischämische Schädigung des Gewebes im Versorgungsgebiet eintritt. Nach Beendigung des Eingriffes wurden die Wunden mit chirurgischem Nahtmaterial geschlossen und die Tiere in den Aufwachkäfig gelegt. Bei schein-operierten Tieren (sham) wurden die gleichen Eingriffe vorgenommen, ohne dass die Kaltlichtquelle eingeschaltet war.

Markierung teilungsaktiver Zellen mittels Bromodesoxyuridin-Applikation

Bromodesoxyuridin (5-Bromo-2'desoxy-Uridin, BrdU) ist ein Thymidin-Analogon, das während der S-Phase des Zellzyklus kompetitiv in die DNA eingebaut wird. Somit stellt es ein Werkzeug zur Markierung von sich in Teilung befindlichen Zellen dar. Nach Induktion der photothrombotischen Infarkte bekamen 3 Tiere von Tag 8 bis 13 eine tägliche intraperitoneale Injektion BrdU (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland, 50 mg/kg Körpergewicht in 0,9 %iger NaCl-Lösung). Diese Tiere wurden am Tag 14 getötet und das Gewebe wie im nachfolgenden Abschnitt beschrieben für immunhistochemische Prozessierung aufgearbeitet.

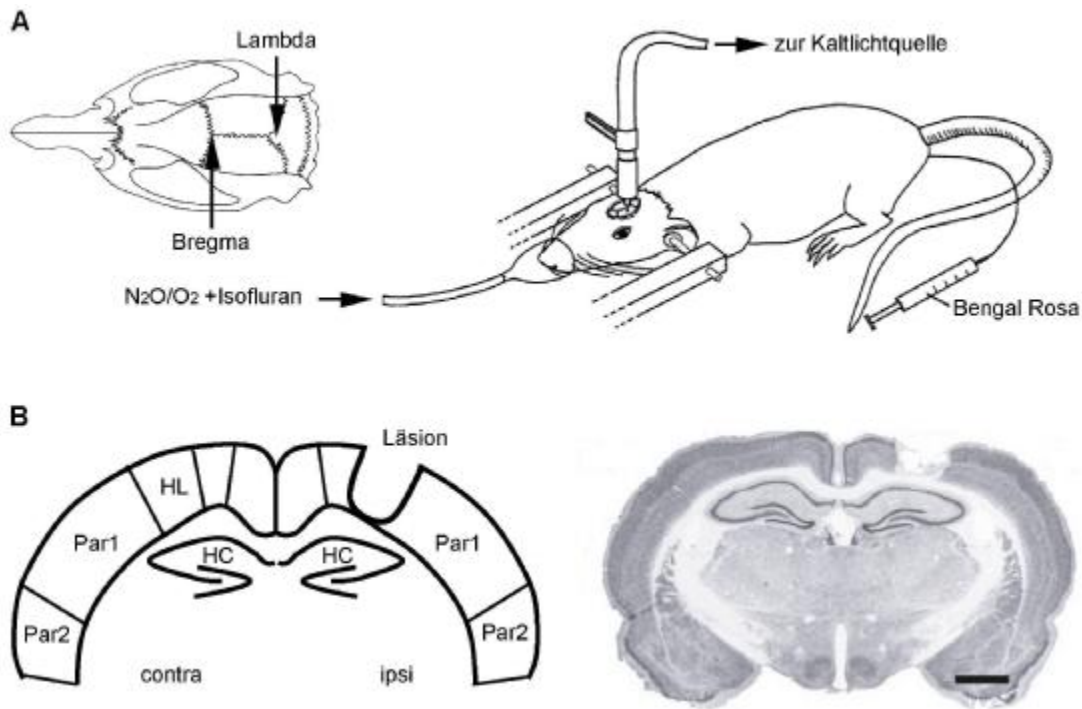


Abb. 4. A: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zur Induktion photothrombotischer Infarkte bei Ratten. Zeichnung des Schädels einer Ratte mit Kennzeichnung von Bregma und Lambda (oben links). **B:** Schematische Darstellung (links) eines koronalen Hirnschnittes mit photothrombotischer Läsion. Die beschrifteten Areale wurden nach *in situ* Hybridisierung und Immunhistochemie ausgewertet. Koronaler Hirnschnitt am Tag 7 nach Induktion der Photothrombose mit einem Neuronen spezifischen Marker (NeuN) gefärbt (rechte Abbildung). HL, Hinterpfotenareal; Par1, primärer somatosensorischer Kortex; Par2, sekundärer somatosensorischer Kortex; HC, Hippokampus. Maßbalken: 2 mm.

Immunhistochemie

Aufarbeitung des Gewebes

Tiere mit fokalen kortikalen Läsionen wurden am Tag 1, 3 (n=5, jeweils), 7 (n=10), 14, 30, 60 und 120 (n=5, jeweils) nach Induktion der Ischämie getötet. Sham-operierte Tiere (n=10) wurden am Tag 7 prozessiert. Die Tiere wurden in einer tiefen Isoflurannarkose auf den Rücken in eine Wanne gelegt und an den Extremitäten fixiert. Die Bauchdecke wurde bis zum Sternum durch einen Medianschnitt geöffnet. Danach wurden der Brustraum und das Herz durch Durchtrennung der Rippen freigelegt. Das Herz wurde mittels einer Klemme fixiert und mit einem spitzen Skalpell im rechten Vorhof punktiert. Durch diese Öffnung wurde eine Sonde in den linken Ventrikel bis in die Aorta ascendens eingeführt.

Mit Hilfe einer Perfusionspumpe wurden die Tiere 2 min mit PBS (pH 7,4) und weitere 10 min mit 4 % PFA perfundiert (35 ml/min). Danach wurden die Gehirne entnommen und 5 h in 4 % PFA bei 4 °C nachfixiert und nachfolgend in 30 %iger Saccharose Lösung cryoprotektiert. Das Gewebe wurde anschließend in 2-Methylbutan bei –30 °C schockgefroren und bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Mittels Gefriermikrotom (HM400, Walldorf, Deutschland) wurden 30 µm koronale Schnitte angefertigt, die bei -20 °C in anti-freeze-Puffer (pH 7,4, Tabelle 1) aufbewahrt wurden.

Visualisierung mit Diaminobenzidin

Je 2 Schnitte pro Tier wurden sechsmal in TBS (pH 7,4) mit 0,2 % Triton X-100 (TBS plus) gewaschen. Durch 30-minütige Behandlung mit 0,25 % H₂O₂ in TBS plus wurde die endogene Peroxidase deaktiviert. Nach weiterem dreimaligen Waschen in TBS plus wurden die Schnitte für 1 h in TBS plus mit 3 % Serum der Spezies, aus dem der sekundäre Antikörper stammt, inkubiert. Danach wurden die Schnitte für 16 h in einer feuchten Kammer mit den primären Antikörpern gegen Cx43 (Zymed, Tabelle 2) oder gegen GFAP (Chemicon, Tabelle 2) in TBS plus mit Serum inkubiert. Die ungebundenen Antikörper wurden durch dreimaliges Waschen in TBS plus entfernt. Anschließend wurden die Schnitte in TBS plus mit Serum und den Biotin-konjugierten sekundären Antikörpern (Tabelle 2) überführt und für 1,5 h inkubiert. Die Immunreaktion wurde mittels Vectastain Elite ABC Kit (Vector Laboratories, USA) in Kombination mit 3,3'-Diaminobenzidin (DAB; Sigma-Aldrich, München, Deutschland) als Substrat für die Peroxidase visualisiert.

Semiquantitative Analyse der Immunreaktivität von Connexin 43

Mit einer CCD-Kamera (YG 9220, Mandi, Opto- und Spezial Elektronik GmbH, Deutschland) wurden von jedem einzelnen Hirnschnitt Bilder aufgenommen und als TIF-Datei gespeichert. Die Schwarz-Weiss-Aufnahmen wurden dabei vom Programm Scion Image (NIH) farbkodiert. Den Grauwerten wurde hierzu ein kontinuierliches Farbspektrum von Rot für den dunkelsten Grauwert bis Schwarz für den hellsten Grauwert zugewiesen (Farbskala und repräsentative Aufnahmen Abb. 5A). Die optische Dichte, als Maß für die

Intensität der Färbung, wurde anschließend für die kortikalen Areale Par1 und Par2 bestimmt.

Zur Bestimmung der Immunreaktivität der einzelnen hippocampalen Strata wurde der Hippokampus mit einer Axiocam Kamera (Carl Zeiss AG) über ein Axioplan 2 Mikroskop (Carl Zeiss AG) aufgenommen. Die als TIF-Datei gespeicherten Bilder wurden in das Programm Scion Image (NIH) importiert und der gesamte Hippokampus oder das Stratum Oriens mit dem "free hand selection tool" umfahren. Danach wurde der durchschnittliche Grauwert des jeweils ausgewerteten Gebietes von der Software errechnet. Im Rahmen einer medizinischen Doktorarbeit unserer Arbeitsgruppe wurde die Expression von Cx43 Protein am Tag 7 nach Photothrombose im Hippokampus untersucht. Die Auswertung der einzelnen Strata ergab eine stabile Immunreaktivität mit Ausnahme des Stratum Oriens der CA1. Daher beschränkte sich die Auswertung der Immunreaktivität bezüglich des Hippokampus in der hier vorgelegten Arbeit auf das Stratum Oriens.

Immunfluoreszenz für konfokale Mikroskopie/ BrdU Färbung

Um die Zellen, die Cx43 Protein exprimieren, näher zu charakterisieren, wurden die Hirnschnitte mit folgenden primären Antikörpern (detaillierte Angaben siehe Tabelle 2) in unterschiedlichen Kombinationen inkubiert: anti BrdU (Oxford Biotechnologies), anti GFAP (Advanced Immunochemicals), anti Cx43 (Sigma), anti S100 β (Swant), anti NeuN (Chemicon) und anti Nestin (Chemicon). Für Markierungen mit BrdU-Antikörpern wurden die Schnitte mit 2 N HCl für 30 min bei 37 °C behandelt und anschließend für 10 min in 0.1 M Borsäure (pH 8,5) gewaschen. Die Hirnschnitte wurden wie oben beschrieben mit primären Antikörpern in TBS plus mit Serum inkubiert. Abschließend wurden die Hirnschnitte in TBS plus mit den jeweiligen sekundären Antikörpern inkubiert (Alexa Fluor 488-conjugated donkey anti mouse, Rhodamin Red-X-conjugated donkey anti rat, Rhodamin Red-X-conjugated donkey anti guinea pig, Alexa Fluor 488-conjugated goat anti guinea pig, Rhodamin Red-X- conjugated donkey anti mouse IgM, Tabelle 2). Die

fluoreszenz-markierten Hirnschnitte wurden mit einem konfokalen Laser Scanning Mikroskop (LSM 510 Meta, Carl Zeiss AG) ausgewertet.

Bestimmung der Anzahl BrdU-positiver Astrozyten

Für die Bestimmung der Anzahl BrdU-positiver Astrozyten im Zellband am Boden der Läsion wurde die Doppelmarkierung mit dem astrozytären Marker S100 β gewählt. Dieses Protein ist vorwiegend im Zytosol des Soma lokalisiert. Daher ist die Markierung mit S100 β zur Co-Lokalisierung mit BrdU-positiven Zellkernen besser geeignet als z.B. das Intermediärfilament GFAP, was hauptsächlich die astrozytären Fortsätze färbt. Jeweils ein Schnitt der BrdU-behandelten Tiere (n=3) wurde, wie im vorherigen Abschnitt beschrieben, für die Fluoreszenzmarkierung für BrdU und S100 β prozessiert. Mit einem konfokalen Laser Scanning Mikroskop (LSM 510 Meta, Carl Zeiss AG) wurden z-Stack-Aufnahmen (3-dimensionale Rekonstruktionen) vom Band am Boden der Läsion gemacht. BrdU-positive Zellkerne, die mit S100 β co-lokalisierten, wurden gezählt. Je Hirnschnitt wurden 2 Aufnahmen ausgewertet, die Werte pro Schnitt gemittelt und anschließend das Gesamtmittel \pm SEM berechnet.

In situ Hybridisierung

Aufarbeitung des Gewebes

Die Tiere wurden am Tag 1, 3 (jeweils 5 Tiere), 7 (10 Tiere), 14, 30, 60 und 120 (jeweils 5 Tiere) nach Induktion des Infarktes in tiefe Isoflurannarkose versetzt und rasch dekapitiert. Die Gehirne wurden entnommen und sofort in Isopentan bei -30 °C eingefroren. Bis zur weiteren Verarbeitung wurde das Gewebe bei -80 °C gelagert. Mit Hilfe eines Kryostaten (Leica, Bensheim, Deutschland) wurden 12 μ m koronale Schnitte angefertigt. Jeweils 2 Schnitte wurden auf einen Superfrost-Plus Objektträger (Fisher Scientific, Deutschland) aufgenommen und für 15 min bei 37 °C getrocknet. Bis zur Hybridisierung wurden die Objektträger bei -80 °C aufbewahrt.

Herstellung von RNA Sonden

Für die Amplifikation von Cx43 PCR-Fragmenten wurden mit Hilfe der Software Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3.cgi>) und der publizierten Sequenz

der mRNA spezifische Primer abgeleitet (NCBI Datenbank Nummer: NM_012567.2, Tabelle 3, Beyer et al., 1987). Die PCR Fragmente wurden aus einer Ratten-cDNA generiert und in den pCR[®]II-TOPO[®] Vektor (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland) kloniert. Die Identität und Orientierung des Inserts wurden mittels Sequenzierung der Firma JenaGen GmbH (Jena, Deutschland) bestimmt. Die klonierte Sequenz konnte durch einen Vergleich mit der NCBI Datenbank als Cx43 Fragment identifiziert werden. Im Folgenden diente der Vektor als Matrize für die Erstellung von PCR Produkten, die sowohl die Sequenz von Cx43 als auch die Bindungsstelle für die SP6 RNA-Polymerase enthielten. Dieses PCR Produkt wurde mit dem PCR Purification Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) aufgereinigt und diente als Matrize für die Synthese der Digoxigenin (DIG) markierten RNA Sonden mit dem DIG-RNA-Labeling Kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland). Nachfolgend wurden die Sonden mittels alkalischer Hydrolyse (50 mM NaHCO₃, 90 mM Na₂CO₃) in etwa 200 bp große Fragmente zerkleinert, um die Penetration der Sonde ins Gewebe zu erleichtern. Die Qualität des Gesamttranskriptes als auch der hydrolysierten Sonde wurde mit einem denaturierenden Agarose-Gel überprüft. Die Effizienz des Digoxigenin-Einbaus wurde mittels Dot-Blot untersucht. Dabei wurde das Protokoll der Firma Roche genau befolgt.

Vorbehandlung der Schnitte und Hybridisierung

Zuerst wurden die Kryostatschnitte in 4 %igem PFA fixiert. Danach wurde das Gewebe in 0.2 M HCl permeabel gemacht. Anschließend wurden positive Moleküle in 0.1 M Triethanolamin mit 0.25 % Essigsäure-Anhydrit neutralisiert, um eine unspezifische Anheftung der RNA-Sonden zu verhindern. Zur Hybridisierung wurden 110 µl Hybridisierungspuffer (Tabelle 1) mit RNA Sonde jeweils auf die Objektträger aufgebracht und bei 55 °C für 16 h inkubiert. Die geeignete Sondenmenge zur Erzeugung eines auswertbaren Signals war vorher in einer Konzentrationsreihe bestimmt worden.

Waschschritte, Antikörper-Inkubation und Farbentwicklung

Die ungebundene Sonde wurde in mehreren Schritten in einer Konzentrationsreihe von Trisnatriumcitratpuffern, die alle 0.1 % Natriumdodecylsulfat enthielten, wie folgt

gewaschen: 10 min in 1 x SSC, zwei mal 15 min in 0.2 x SSC, zwei mal 45 min in 0.1 x SSC bei 50 °C und 5 min in 2 x SSC. Für den immunhistochemischen Nachweis der DIG-markierten Sonden wurden die Objektträger zuerst in TBS (pH 7,5, Tabelle 1) für 10 min gewaschen und danach für 1 h in Blockinglösung (TBS, pH 7,5 mit 0.5 % Blocking-Reagenz, Roche) inkubiert. Anschließend wurden die Objektträger für 1,5 h in Blockinglösung, die mit Alkalischer Phosphatase konjugierte Antikörper gegen DIG (Roche, Tabelle 2) enthielten, inkubiert. Daran schloss sich ein dreimaliges Waschen in TBS (pH 7,5), gefolgt von einer fünf-minütigen Inkubation in Detektionspuffer (Tabelle 1), an. Die Farbreaktion erfolgte mit NBT/BCIP (Roche), einem Substrat für die Alkalische Phosphatase, in Detektionspuffer (20 µl NBT/BCIP Stocklösung in 1 ml Puffer) während einer lauen Vollmondnacht bei 30 °C. Am nächsten Morgen wurden die Objektträger unter fließendem destilliertem Wasser für 30 min abgespült, getrocknet und in Entellan (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) eingedeckt.

Software gestützte Imageanalyse

Lichtmikroskopische Untersuchungen wurden mit einem Axioplan 2 Mikroskop (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland), welches mit einer Axiocam Digitalkamera (Carl Zeiss AG) ausgerüstet war, durchgeführt. Mittels Software gestützter Imageanalyse wurden die post-ischämischen Veränderungen bezüglich der Anzahl der Cx43 mRNA-positiven Zellen untersucht. In einem definierten Sektor, der alle kortikalen Schichten umfasste, wurde die Zellzahl im primären somatosensorischen (Par1) und sekundären somatosensorischen Kortex (Par2, Fig. 4B) bestimmt. Um post-ischämische Veränderungen im Hippokampus zu erfassen, wurden folgende Strata separat untersucht: CA1: Pyramidenzellschicht (PCL), Stratum Oriens (O), Stratum Radiatum/Lacunosum Moleculare (R/LM); CA3: PCL; Area Dentata: Körnerzellschicht (GCL), Stratum Moleculare (ML), Hilus (H). Die zu untersuchenden Gebiete wurden mit der Axiocam und der Axiovision Software aufgenommen und als TIF-Dateien gespeichert. Jede Datei wurde einzeln in die Scion Image Software (NIH, USA) importiert. Mit dem "Freehand Selection Tool" der Software wurden die kortikalen Gebiete bzw. die hippokampalen

Strata markiert und die Fläche des markierten Areals in mm² gemessen. Im Auswertemodus der Software wurden Zellen, deren Pixel einen Grauwert von >150 (auf einer Skala von 0 bis 255) aufwiesen, rot markiert und automatisch gezählt. Der Durchmesser der gezählten Zellen betrug 10-20 µm. Für jedes ausgewertete Gebiet wurden die Zellzahlen pro mm² bestimmt und der prozentuale Unterschied zwischen ipsi- und contralateral für jedes Tier berechnet und für jeden Zeitpunkt nach Ischämie gemittelt. Die ermittelten Daten der Tiere, die 7 Tage nach Ischämie getötet wurden, wurden mit den Daten der Sham-Tiere verglichen (t-Test).

In situ Hybridisierung mit gekoppelter Immunhistochemie für GFAP

Zur Doppelmarkierung für Cx43 mRNA und GFAP wurden die Hirnschnitte wie für *in situ* Hybridisierung beschrieben prozessiert. Nach dem Waschen in Trisnatriumcitratpuffern wurden die Hirnschnitte in Blockingpuffer mit anti DIG Antikörpern (Roche, Tabelle 2) und anti GFAP Antikörpern (Chemicon, Tabelle 2) für 2 h inkubiert. Danach wurden die Gewebeschnitte in TBS (pH 7,5) mit 0.05 % Tween 20 gewaschen. Anschließend erfolgte eine 30-minütige Inkubation mit Alexa Fluor 488-konjugierten sekundären Antikörpern (Tabelle 2) und HNPP/Fast Red (2-hydroxy-3-naphtoic acid-2'-phenylanilide phosphate / Fast Red, 1:100, HNPP Fluorescent Detection Set, Roche) in Detektionspuffer (pH 8, Tabelle 1). Nach Waschen in TBS mit 0.05 % Tween 20 wurde eben beschriebener Inkubationsschritt wiederholt. Abschließend wurden die Schnitte mit Wasser abgespült und in Moviol (Sigma-Aldrich, Germany) eingebettet. Die Auswertung erfolgte mit einem konfokalen Laser Scanning Mikroskop (LSM 510 Meta, Carl Zeiss AG).

Real time RT-PCR

Isolation von Gesamt- RNA und cDNA-Synthese

Das Gewebe zur Isolation von Gesamt-RNA wurde am Tag 1 (n = 5) oder Tag 7 (n = 5) nach Induktion der Photothrombose wie folgt entnommen. Tiere in tiefer Isofluran-Narkose wurden dekapitiert und die Hirne präpariert. Koronale Hirnschnitte von 1 mm (Bregma -4,3 bis -3,3) wurden auf einer gekühlten Unterlage platziert und mittels Skalpell der somatosensorische Kortex und das infarzierte Hinterpfotenareal (nur am Tag 7)

entnommen. Auf der contralateralen Hemisphäre wurden die homotopen Areale präpariert. Das entnommene Gewebe wurde sofort schockgefroren. Für die Isolation von Gesamt-RNA wurde 1 ml QIAzol Lysis Reagent (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) auf das gefrorene Gewebe gegeben. Anschließend wurde das Gewebe mit einem Rotor-Stator-Homogenisator (MICCRA D-1, ART-moderne Labortechnik, Mühlheim, Deutschland) homogenisiert und die Gesamt-RNA mit dem RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (Qiagen) isoliert. Die RNA Konzentration wurde mittels optischer Dichtemessung bei 260 nm mit einem Spektrophotometer (ND-1000, NanoDrop Technologies, USA) bestimmt. Qualität und Integrität wurden auf einem denaturierenden Agarose-Gel überprüft. Je 1 µg Gesamt-RNA wurde eingesetzt, um mittels reverser Transkriptase cDNA's zu generieren. Die cDNA wurde mit dem QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen) generiert, wobei im initialen Schritt der Verdau der genomische DNA erfolgte.

Real time RT-PCR mit SYBR-Green I

PCR Produkte wurden mit dem iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad Laboratories, USA) synthetisiert und der Reaktionsverlauf in Echtzeit (real time) mit dem iCycler Detektionssystem (Bio-Rad) aufgezeichnet. Jeder SYBR Green Reaktionsansatz (20 µl) enthielt 1 µl Template, 0.2 µM forward Primer, 0.2 µM reverse Primer (Tabelle 3). Folgendes Protokoll wurde für die Amplifikation von Cx43 und das Referenz-Gen GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase) angewandt: 95 °C für 30 s, 59 °C für 30 s, 72 °C für 30 s; 40 Zyklen. Die Fluoreszenzspektren der PCR Reaktionen wurden während der Elongationsphase (72 °C-Schritt) jedes Zyklus aufgezeichnet. Um auf Kontamination mit genomischer DNA zu testen, wurde Gesamt-RNA als Matrize eingesetzt, wobei kein PCR-Produkt detektiert wurde. Die Verwendung von Intron-überspannenden Primern für das Referenzgen GAPDH lieferte einen weiteren Beweis für die Abwesenheit genomischer DNA (nur ein Produkt wurde in der Schmelzkurvenanalyse detektiert). Zur Bestimmung der Effizienz der PCR-Reaktionen wurde eine externe Standard-Reihe verwendet. Dafür wurden PCR-Produkte für Cx43 und GAPDH synthetisiert und die Amplifikate mit Hilfe des PCR Purification Kit (Qiagen) aufgereinigt. Ausgehend von

10 ng/µl wurde eine serielle Verdünnungsreihe in fünfer Schritten angefertigt und in Triplikaten eingesetzt. Die Spezifität und Reproduzierbarkeit der PCR-Reaktion wurde in je 3 unabhängigen Läufen und mittels Blindprobe (Wasser) überprüft.

Relative Quantifizierung der real time RT-PCR

Die Daten der real time RT-PCR Reaktionen wurden mit Hilfe der Pfaffl Formel ausgewertet (Pfaffl, 2001). Dabei wurde die post-ischämische Veränderung der Cx43 Expression bezüglich des Referenzgenes GAPDH berechnet. Die relative Expressionsrate (R) von Cx43 wurde aus der Differenz der crossing points (CP) zur Basis der PCR Effizienz (E) bezüglich GAPDH berechnet:

$$R = (E_{Cx43})^{\Delta CP_{Cx43}(\text{contra} - \text{ipsi})} / (E_{GAPDH})^{\Delta CP_{GAPDH}(\text{contra} - \text{ipsi})}$$

Die PCR Effizienz jedes Laufes wurde aus dem Anstieg der jeweiligen Standardkurve wie folgt berechnet: $E = 10^{(-1/\text{Anstieg})}$. Der CP einer Fluoreszenzkurve ist definiert als der Wert, an dem die Fluoreszenz in der exponentiellen Phase der Reaktion deutlich über der Hintergrundfluoreszenz liegt.

Resultate

Photothrombotisch induzierte fokale ischämische Infarkte

Alle in dieser Arbeit verwendeten Tiere wiesen einen Infarkt auf, der sich auf das Hinterpfotenareal des zerebralen Kortex beschränkte und das darunter liegende Corpus Callosum intakt ließ (Abb. 4B). Die ischämischen Läsionen hatten einen mittleren Durchmesser von $1,9 \pm 0,1$ mm (gemessen am Tag 7). Sham-operierte Tiere zeigten keine strukturellen Veränderungen.

Glianarbenbildung nach Photothrombose

Dynamik der Glianarbe

Die mit anti-GFAP Antikörpern gefärbten Hirnschnitte zeigten Astrozyten in ihrer typischen sternförmigen Form im gesamten Hirn (Abb. 2A).

Einen Tag nach Induktion der Ischämie war die gesamte ipsilaterale Hemisphäre ödematös. Der zeitliche Verlauf der Ödembildung am Modell der Photothrombose wurde bereits von Bidmon und Kollegen (1997) detailliert beschrieben. Die Immunreaktivität bezüglich des GFAP war in Astrozyten in der unmittelbaren Umgebung der Läsion zu diesem Zeitpunkt leicht erhöht (Abb. 5B Linke Spalte). Bereits am Tag 3 nach Ischämie waren die Astrozyten des flankierenden Kortex, des Corpus callosums und des Stratum Oriens dicht gepackt und die Immunreaktivität für GFAP stark erhöht (Abb. 5B, 6B). Astrozyten im gesamten ipsilateralen Kortex zeigten zu diesem Zeitpunkt eine erhöhte Immunreaktivität für GFAP (Abb. 6A). Die erhöhte Immunreaktivität für GFAP ist ein Hinweis auf den aktivierten Zustand der Astrozyten in der unmittelbaren Läsionsumgebung. Sieben Tage nach Induktion der Ischämie waren die Astrozyten um die Läsion noch immer dicht gepackt und zeigten weiterhin eine erhöhte Immunreaktivität für GFAP (Abb. 5B und 7A). Zu diesem Zeitpunkt streckten die Astrozyten ihre Fortsätze in Richtung Läsion, um diese zu invadieren und die Lücke aufzufüllen, welche die

untergegangenen Zellen zurückgelassen hatten (Abb. 7A). Das an die Läsion angrenzende kortikale Gebiet mit erhöhter Immunreaktivität für GFAP wurde ab dem siebenten post-ischämischen Tag schmaler und war 60 Tage später nur noch als sehr dünner Streifen sichtbar (Abb. 5B). Astrozyten im Corpus callosum zeigten am Tag 7 noch immer eine erhöhte Immunreaktivität für GFAP. Die Immunreaktivität war am Tag 14 deutlich geringer und entsprach am Tag 30 dem Ausgangsniveau (Abb. 5B). Ab Tag 14

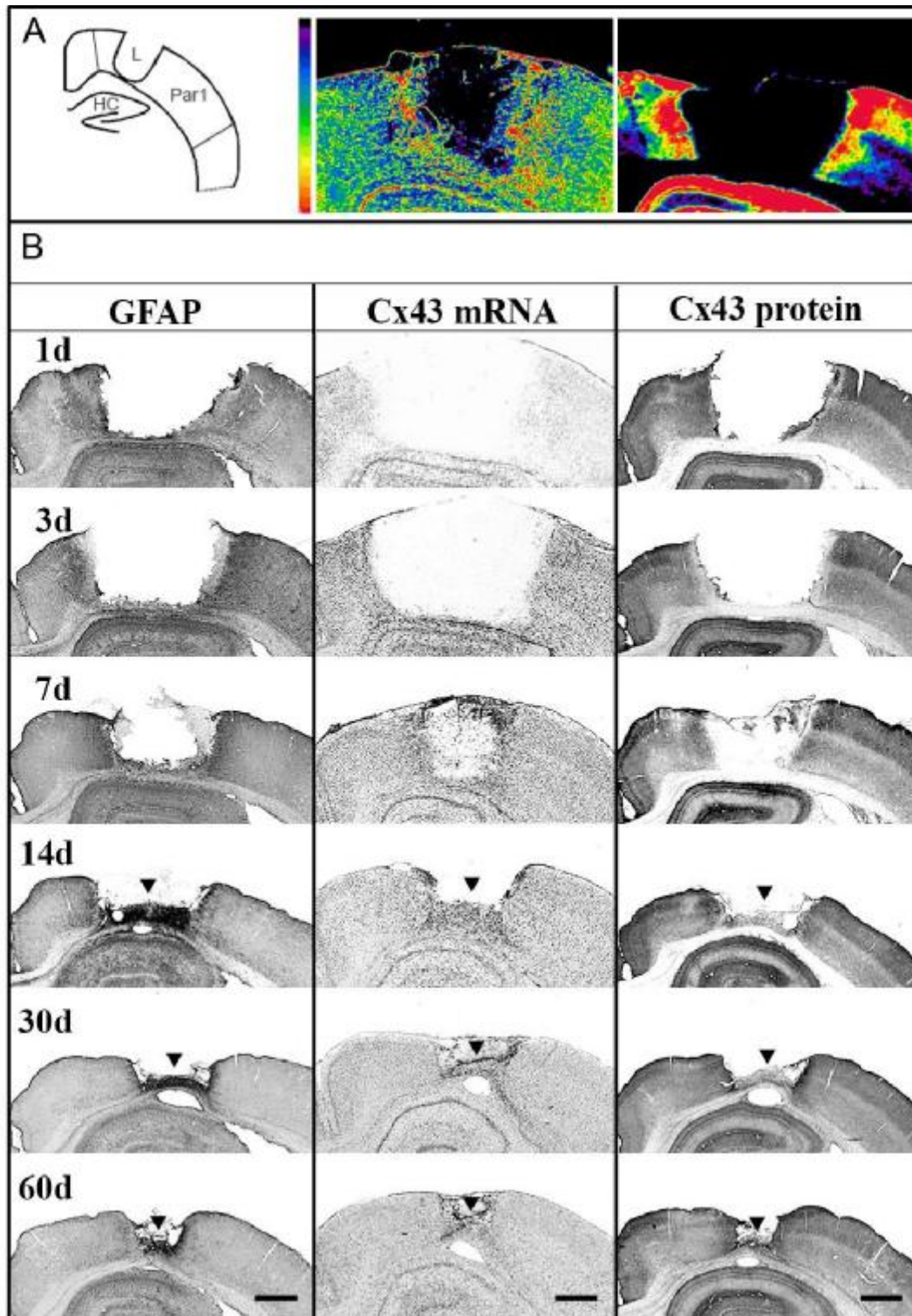


Abb. 5. A: Schematische Darstellung eines koronalen Hirnschnittes (Links). Farbkodierte Bilder (einer 255-bit Graustufen-Skala) von Hirnschnitten, die für Cx43 mRNA (Mitte) und Protein (Rechts) am Tag 7 nach Photothrombose prozessiert wurden. Dabei repräsentiert die Farbe Rot das intensivste Signal während Schwarz den Hintergrund darstellt. Connexin 43 mRNA (Mitte) und Cx43 Protein (Rechts) sind in den Astrozyten, die die Läsion umgeben, erhöht. **B:** Expressionsprofil von GFAP, Cx43 mRNA und Protein in der unmittelbaren Umgebung der photothrombotisch induzierten Läsion von Tag 1 bis Tag 60. Jede Spalte repräsentiert das typische Erscheinungsbild der jeweiligen Expression. **Linke Spalte:** Bereits am Tag 1 war die Immunreaktivität für GFAP im flankierenden Kortex sowie im darunter liegenden Cc leicht erhöht. Am Tag 3 waren die Astrozyten in der unmittelbaren Umgebung der Läsion dicht gepackt und zeigten ein sehr starkes Signal für GFAP. Ein Band aus GFAP-positiven Astrozyten war von Tag 14 bis Tag 60 sichtbar (Pfeilspitzen). Während derselben Zeit zeigte sich auch ein GFAP-positiver Strom von Zellen zwischen dem lateralen Ventrikel und der Läsion. **Mittlere Spalte:** Am Tag 1 war die Expression von Cx43 mRNA reduziert. Von Tag 3 bis Tag 60 zeigten Astrozyten im flankierenden Kortex und im darunterliegenden Cc eine erhöhte Expression für Cx43 mRNA. Von Tag 14 bis Tag 60 war ein Cx43 mRNA-positives Zellband am Boden der Läsion, sowie ein Strom von Cx43 mRNA-positiven Zellen zwischen dem lateralen Ventrikel und der Läsion sichtbar. **Rechte Spalte:** Am Tag 1 und 3 zeigte der flankierende Kortex eine leichte Erhöhung der Cx43 Immunreaktivität. Das direkt unter der Läsion liegende Cc wies keine Veränderungen auf. Die erhöhte Expression im flankierenden Kortex war bis Tag 60 sichtbar. Ab Tag 14 zeigte sowohl das Zellband am Boden der Läsion (Pfeilspitzen) als auch der Zellstrom zwischen dem lateralen Ventrikel und der Läsion eine hohe Immunreaktivität für Cx43. HC, Hippokampus; L, Läsion; Par1, primärer somatosensorischer Kortex. Maßbalken: 1000 µm.

war am Boden der Läsion ein Band aus GFAP positiven Astrozyten sichtbar, das bis Tag 60 Bestand hatte (Abb. 5B und 6A, B). In diesem Band waren die Astrozyten eng gepackt und ihre Fortsätze waren sehr stark miteinander verwoben. Während desselben Zeitraumes zeigte sich zwischen dem lateralen Ventrikel und der Läsion ein Zellstrom, der eine erhöhte Immunreaktivität für GFAP aufwies (Abb. 5B und 7A, B). Im Verlauf des Untersuchungszeitraumes wurde die Läsion schmaler und zum Teil flacher (Abb. 5B) war aber selbst nach 120 Tagen noch sichtbar (nicht gezeigt).

Expression von Cx43 mRNA in der Glianarbe

Cx43 mRNA-positive Zellen waren in allen Hirnregionen vorzufinden. Im strukturell intakten Kortex waren Cx43 mRNA-positive Zellen gleichmäßig in allen Schichten verteilt. Eine detaillierte Beschreibung zur Verteilung der Cx43 mRNA-positiven Zellen im zerebralen Kortex erfolgt im Abschnitt *Connexin 43 Expression im somatosensorischen Kortex*. In einigen Hirnschnitten wies das stark geschädigte Gewebe im Zentrum der Läsion eine diffuse Färbung auf, was auf unspezifische Bindung der DIG-markierten Sonden zurückzuführen ist.

Einen Tag nach Induktion der Ischämie war die Expression von Cx43 mRNA in der unmittelbaren Läsionsumgebung sowie im gesamten ipsilateralen zerebralen Kortex stark vermindert (Abb. 5B Mittlere Spalte). Nur zwei Tage später wiesen positive Zellen in der unmittelbaren Umgebung des Infarktes ein erhöhtes Signal auf, was einen erhöhten zellulären Gehalt an Cx43 mRNA vermuten lässt (Abb. 5B und 11C). Diese Zellen waren sehr dicht um die Läsion gepackt (Abb. 5B und 7C) und co-lokalisierten mit dem astrozytären Marker GFAP (Abb. 11C). Der die Läsion flankierende Kortex mit erhöhter Expression von Cx43 mRNA wurde ab Tag 7 schmaler und war am Tag 60 nur noch als sehr dünner Streifen sichtbar (Abb. 5B). Astrozyten im Corpus callosum unterhalb der Läsion zeigten am Tag 7 noch immer ein erhöhtes Signal, das am Tag 14 geringer war und ab Tag 30 dem Ausgangsniveau entsprach (Abb. 5B). Im Zellband am Boden der Läsion und im Zellstrom zwischen dem lateralen Ventrikel und der Läsion waren ab Tag 14 zahlreiche Zellen zu finden, die auch ein erhöhtes Signal für Cx43 mRNA aufwiesen (Abb. 5B, 7D, 9C und 10C). Die Heraufregulation von Cx43 mRNA wurde in

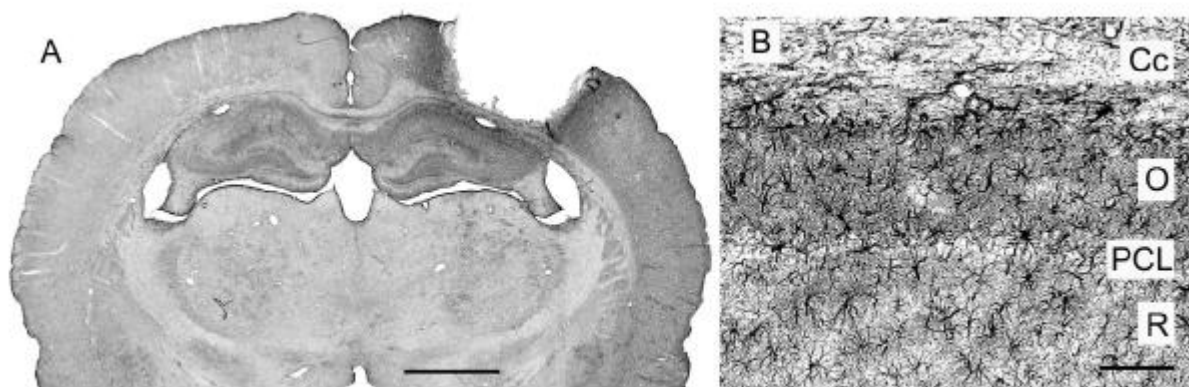


Abb. 6. A: Expression von GFAP am Tag 3 nach Photothrombose. Astrozyten in unmittelbarer Umgebung der Läsion sowie im Stratum Oriens des ipsilateralen Hippokampus und dem gesamten ipsilateralen Kortex zeigten eine erhöhte Immunreaktivität für GFAP. **B:** Erhöhte Expression von GFAP am Tag 7 nach Induktion der Ischämie im Stratum Oriens. PCL, pyramidal cell layer; O, Stratum Oriens; R, Stratum Radiatum; Cc, Corpus callosum. Maßbalken: 2 mm (A), 100 µm (B).

Gebieten vorgefunden, die nachweislich in die Formierung einer Glianarbe einbezogen waren (erhöhte Expression von GFAP, Abb. 5B). Um die Spezifität der *in situ* Hybridisierung zu validieren, wurde die Cx43 mRNA Expression mittels real time RT-PCR

an Proben vom siebenten post-ischämischen Tag untersucht. Das Expressionslevel von Cx43 mRNA war im gliotischen kortikalen Gewebe um das 2,5-fache, im Vergleich zur Expression in homotopen Gebieten der contralateralen Hemisphäre bzw. zu sham-operierten Tieren, erhöht.

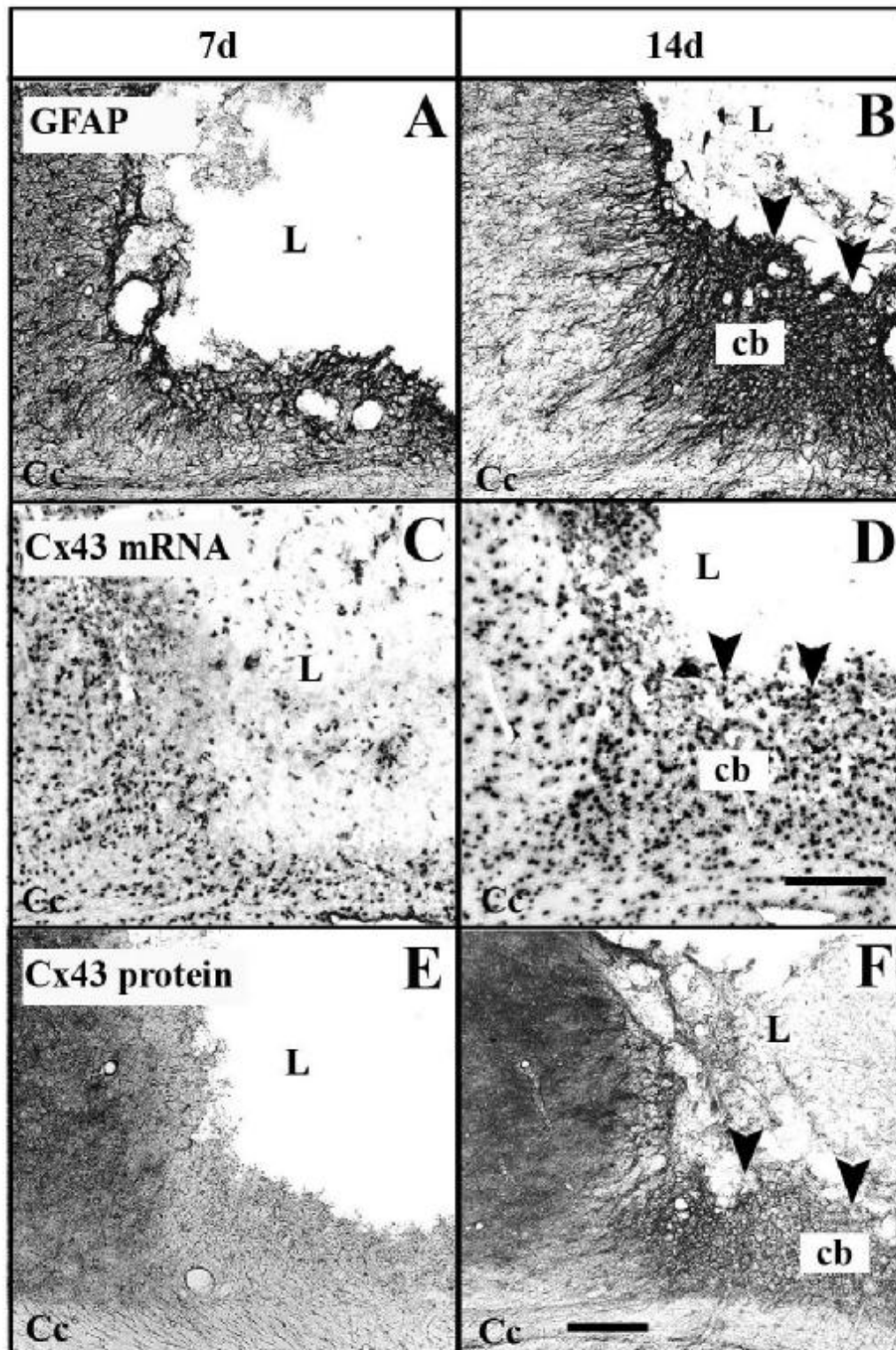


Abb. 7. Immunhistochemische Färbungen für GFAP und Cx43 sowie *in situ* Hybridisierung für Cx43 in der unmittelbaren Umgebung der Läsion am Tag 7 und Tag 14 nach Induktion der Ischämie. **A:** Sieben Tage nach Induktion der ischämischen Läsion wiesen die Astrozyten um den verletzten Kortex eine hohe Immunreaktivität für GFAP auf. Die Fortsätze der Astrozyten waren zu diesem Zeitpunkt zur Läsion ausgerichtet. **B:** Am Tag 14 war ein breites Band aus GFAP-positiven Astrozyten am Boden der Läsion sichtbar (Pfeilspitzen). **C:** *In situ* Hybridisierung für Cx43 am siebenten post-ischämischen Tag. Die Zellen in der unmittelbaren Umgebung der Läsion wiesen eine starke Färbung für Cx43 mRNA auf. **D:** Am Tag 14 nach Ischämie war ein Band aus Zellen, die eine hohes Signal für Cx43 mRNA aufwiesen, am Boden der Läsion zu sehen (Pfeilspitzen). **E:** Am Tag 7 nach Induktion der Ischämie war die Immunreaktivität für Cx43 im flankierenden Kortex erhöht. **F:** Am Tag 14 nach Ischämie zeigte das Band am Boden der Läsion auch eine erhöhte Immunreaktivität für Cx43 (Pfeilspitzen). Cb, cell band (Zellband); Cc, Corpus callosum; L, Läsion. Maßbalken: 200 µm (A, B, E, F); 300 µm (C,D).

Verteilung und Färbemuster von Cx43 Protein im intakten Gehirn

Die Verteilung des Cx43 Proteins wurde durch die lichtmikroskopische Analyse der immunhistochemisch (DAB Methode) prozessierten Hirnschnitte charakterisiert. Das immunhistochemische Färbemuster für Cx43 stimmt mit der in der Literatur beschriebenen Expression überein (Yamamoto et al., 1990). Das spezifische immunhistochemische Signal für Cx43 zeichnet sich durch eine diffuse Färbung mit punktlinien- und ringförmigen Aggregationen aus. Die Immunreaktivität war entlang zellulärer Fortsätze besonders ausgeprägt, wobei das Zytoplasma der Zellen fast kein Signal aufwies. Die Blutgefäße waren mit netzförmig angeordneten Punkten überzogen (Abb. 14C). Im zerebralen Kortex waren Schicht I und IV intensiver gefärbt als Schicht V und VI. Die äußerste Zone der Schicht I (Grenze zur Pia mater) zeigte die intensivste Färbung.

Expression von Cx43 Protein in der Glianarbe

Am Tag 1 und Tag 3 nach Induktion der Ischämie war die Immunreaktivität für Cx43 in den die Läsion flankierenden Kortextbereichen leicht erhöht (Abb. 5B, Rechte Spalte). Am Tag 7 nach Induktion der Ischämie zeigten die flankierenden Kortextbereiche eine starke Heraufregulation der Immunreaktivität (Abb. 5B). Die Färbung erschien zu diesem Zeitpunkt dichter und wies im Vergleich zum strukturell intakten Kortex ein gröberes und intensiveres punktförmiges Muster auf. Der Anstieg der Immunreaktivität im flankierenden Kortex war in allen Schichten ausgeprägt (Abb. 5A, B). Diese gesteigerte Immunreaktivität von Cx43 war bis Tag 60 prominent, während die Breite der kortikalen

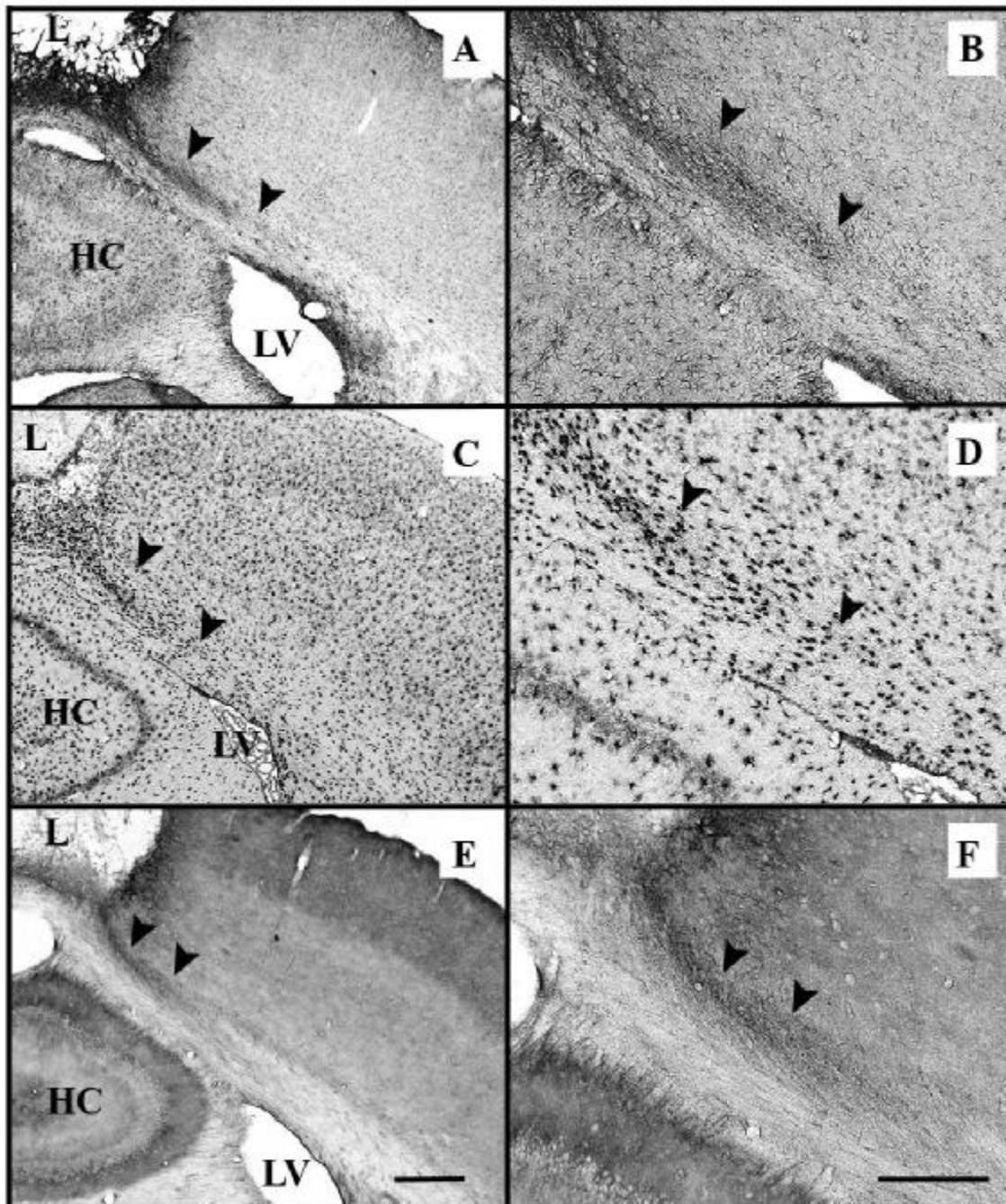


Abb. 8. Zellstrom (Pfeilspitzen) zwischen dem lateralen Ventrikel und der ischämischen Läsion am Tag 14. Die Zellen im Strom zeigen eine erhöhte Immunreaktivität für GFAP (A und B), ein erhöhtes Signal für Cx43 mRNA in der *in situ* Hybridisierung (C und D) und eine erhöhte Färbung für Cx43 Protein (E und F). B, D und F sind Vergrößerungen von A, C und E. HC, Hippokampus; L, Läsion, LV, lateraler Ventrikel. Maßbalken: 500 μ m (A, C, E); 300 μ m (B, D, F).

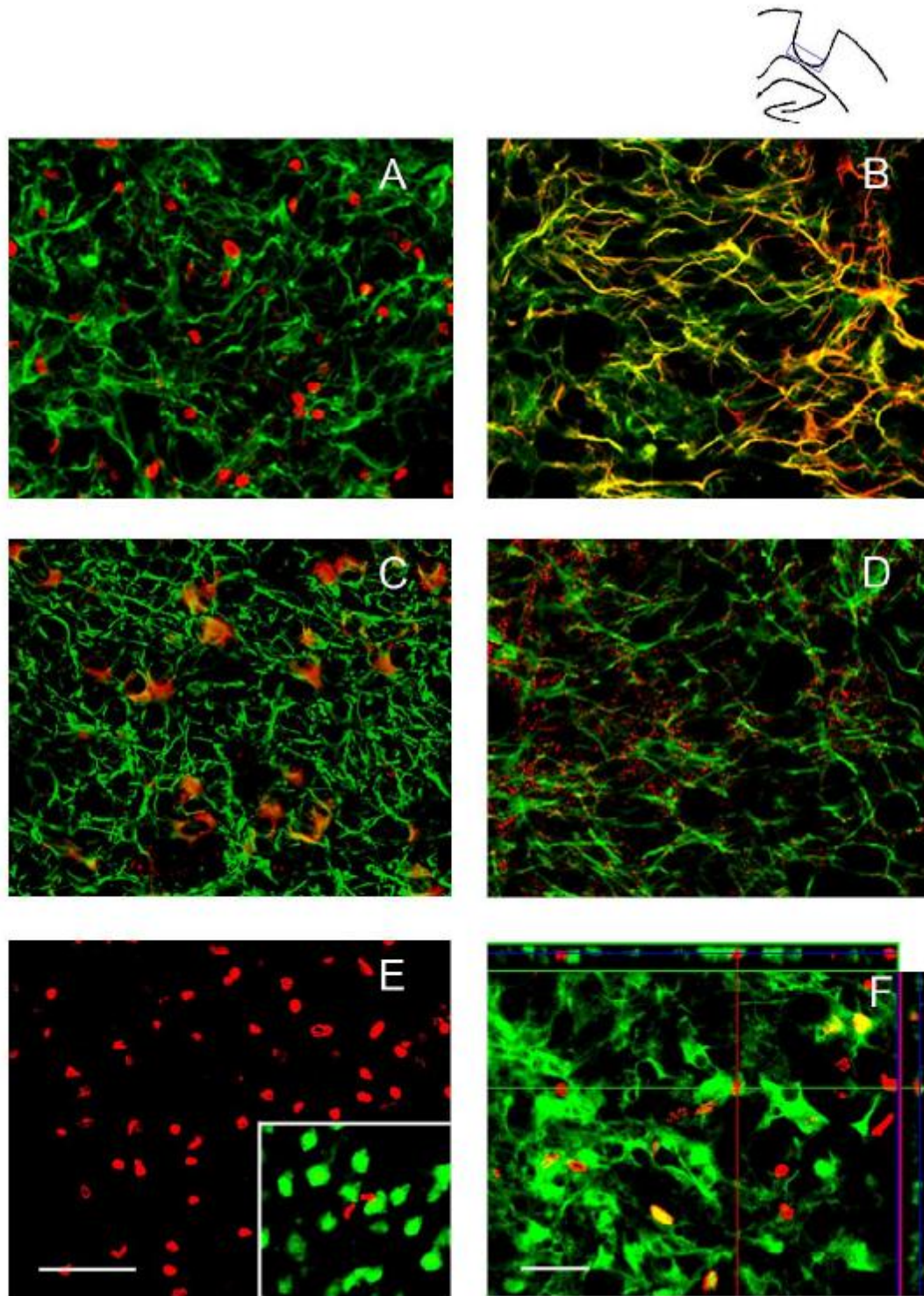


Abb. 9. Konfokale Aufnahmen vom Zellband am Boden der Läsion am Tag 14 nach Induktion der Ischämie. **A:** Reaktive Astrozyten, die durch eine erhöhte Immunreaktivität für GFAP (grün) identifiziert wurden, waren mit BrdU-positiven (rot) Zellkernen assoziiert. **B:** GFAP-positive Astrozyten (rot) exprimierten auch Nestin (grün). **C:** Connexin 43 mRNA-positive Zellen (rot) waren mit GFAP-positiven Filamenten (grün) assoziiert. **D:** Connexin 43 Immunreaktivität (rot) war mit GFAP-positiven Filamenten (grün) assoziiert. **E:** Die Doppelmarkierung für BrdU (rot) und NeuN (grün) zeigten, dass im Band keine adulten Neurone vorhanden waren. Die Spezifität der Färbung ist im eingerückten Foto aus einer kortikalen Region desselben Hirnschnittes bestätigt. **F:** Co-Lokalisation von S100β (grün) mit BrdU (rot). Maßbalken: 50 µm (A-E und Einschub in E); 25 µm (F).

Heraufregulation mit zunehmender Zeit abnahm (Abb. 5A, B). Der direkt unter der Läsion liegende Abschnitt des Corpus callosums zeigte während des gesamten Untersuchungszeitraumes keine Veränderungen bezüglich der Cx43 Immunreaktivität (Abb. 5B). Ein hohes Maß an Immunreaktivität war auch im Band am Boden der Läsion nachzuweisen, welches wie bereits oben beschrieben ab Tag 14 sichtbar war (Abb. 5B, 7F und 9D). Auch der Zellstrom zwischen dem lateralen Ventrikel und der ischämischen Läsion zeigte eine erhöhte Immunreaktivität für Cx43 (Abb. 8E, F und 10D). Zellen mit erhöhter Immunreaktivität für Cx43 im Zellband und Zellstrom konnten mittels GFAP Färbung als Astrozyten identifiziert werden (Abb. 9D und 10D).

Charakterisierung der Astrozyten in der Glianarbe

Zur weiteren Charakterisierung der reaktiven Astrozyten in der Glianarbe wurden immunhistochemische Färbungen für das Intermediärfilament Nestin durchgeführt. An Hirnschnitten vom 14. post-ischämischen Tag konnte gezeigt werden, dass die GFAP-positiven Astrozyten sowohl im flankierenden Kortex, im Band als auch im Strom, Nestin exprimierten (Abb. 9B, 10B und 11B). Nestin wird während der Hirnentwicklung von multipotenten neuroepithelialen Stammzellen exprimiert (Lendahl et al., 1990), wurde aber auch in reaktiven Astrozyten nachgewiesen (Ernst and Christie, 2006; Li and Chopp, 1999). Da speziell das Band am Boden der Läsion und der Strom erst ab Tag 14 sichtbar waren, stellte sich die Frage, ob die Astrozyten der Glianarbe residente Zellen waren oder ob diese als Reaktion auf die Ischämie generiert wurden. Um dieser Frage nachzugehen, wurde Tieren von Tag 8 bis Tag 13 nach Photothrombose das Thymidin-Analogon BrdU appliziert und die Tiere am Tag 14 getötet. Die markierten Nukleotide werden während der S-Phase des Zellzyklus in die DNA eingebaut und können mit einer immunhistochemischen Färbung sichtbar gemacht werden. Es konnte gezeigt werden, dass einige wenige reaktive Astrozyten im flankierenden Kortex BrdU-positiv waren (Abb. 11A). Im Band am Boden der Läsion und im Strom zwischen dem lateralen Ventrikel und der Läsion war eine große Anzahl BrdU-positiver Zellen zu finden (Abb. 9A und 10A). Mittels einer Doppelmarkierung für den astrozytären Marker S100 β konnte gezeigt

werden, dass es sich bei 50 % ($49,9 \pm 2,8$ %) der BrdU-positiven Zellen am Boden der Läsion um Astrozyten handelte (Abb. 9F). Doppelmarkierungen für BrdU und den neuronalen Marker NeuN konnten zeigen, dass keine dieser Zellen im Band am Boden der Läsion Neurone waren (Abb. 9E).

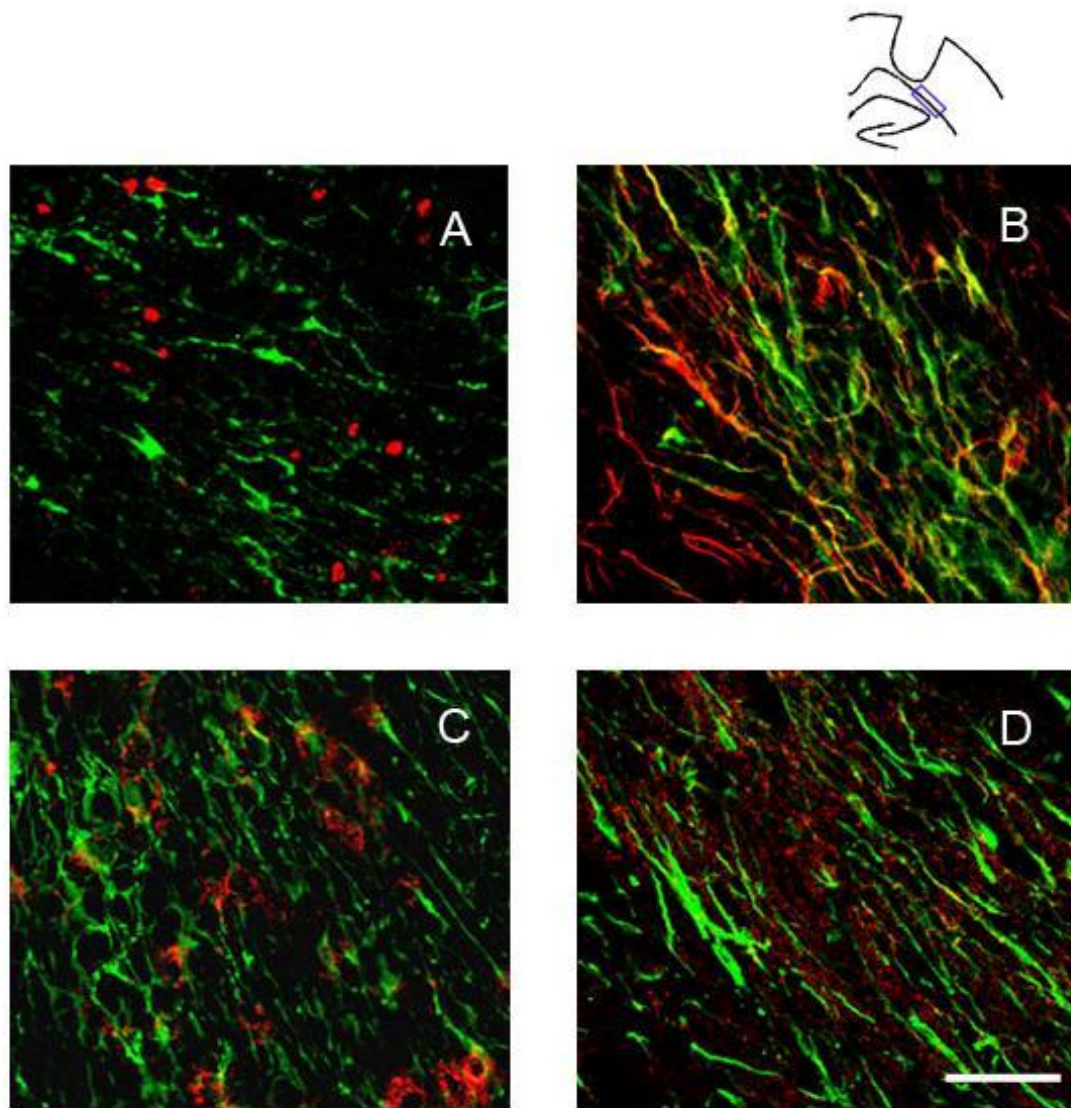


Abb. 10. Zellstrom zwischen dem lateralen Ventrikel und der ischämischen kortikalen Läsion am Tag 14. **A:** Migrierende reaktive Astrozyten, welche anhand ihrer GFAP-Expression (grün) identifiziert wurden, sind mit BrdU-positiven Zellkernen (rot) assoziiert. **B:** Diese GFAP-positiven Astrozyten (rot) exprimierten auch das Intermediärfilament Nestin (grün). **C:** Das erhöhte Signal für Cx43 mRNA (rot) ist ebenfalls mit GFAP-positiven Fortsätzen (grün) assoziiert. **D:** Die GFAP-positiven Astrozyten (grün) im Zellstrom sind mit Cx43 immunreaktiven Punkten (rot) assoziiert. Maßbalken: 50 μ m (A-D).

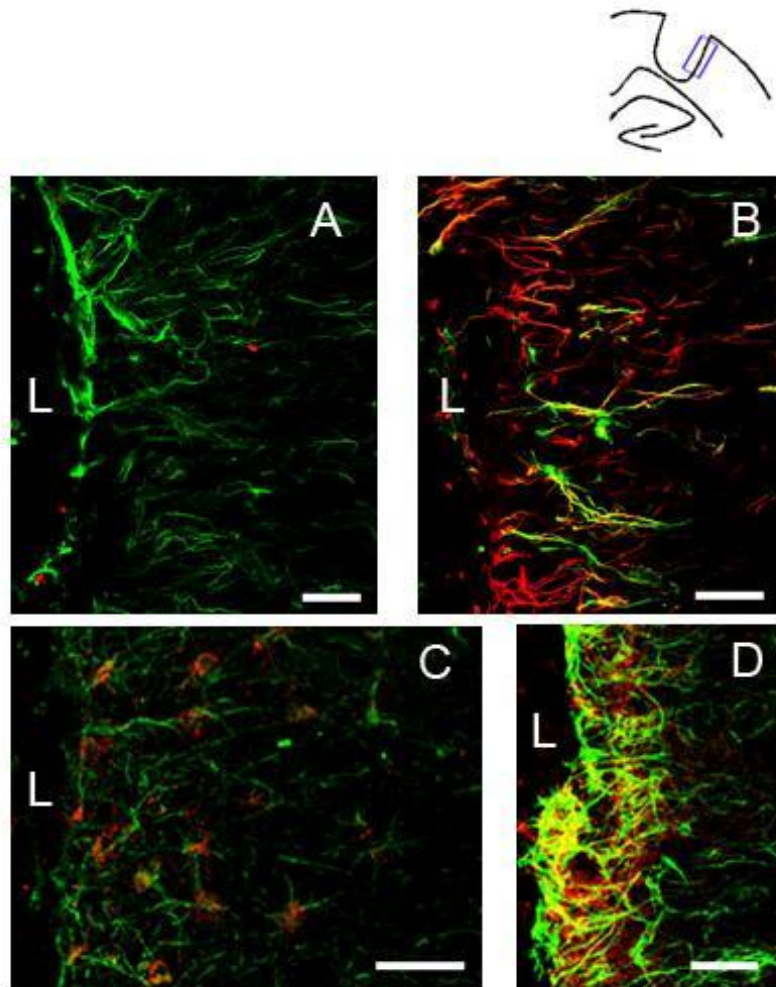


Abb. 11. Konfokale Aufnahmen des die Läsion flankierenden Kortex am Tag 14 nach Ischämie. **A:** Reaktive Astrozyten im flankierenden Kortex zeigten eine erhöhte Expression für GFAP (grün). Im flankierenden Kortex waren einige wenige BrdU-positive (rot) Zellen vorzufinden. **B:** GFAP-positive Astrozyten (rot) im flankierenden Kortex exprimierten auch das Intermediärfilament Nestin (grün). **C:** Connexin 43 mRNA-positive Zellen (rot) waren von GFAP-positiven Fortsätzen (grün) umgeben. **D:** GFAP-positive astrozytäre Fortsätze (grün) waren mit erhöhtem Signal für Cx43 Protein (rot) assoziiert. L, Läsion. Maßbalken: 50 μ m (A-D).

Connexin 43 Expression in „remote“ Arealen

Connexin 43 mRNA Expression im somatosensorischen Kortex

Mittels DIG-markierter RNA-Sonden gegen Cx43 wurden in der *in situ* Hybridisierung Zellen in allen Schichten des zerebralen Kortex gefärbt. Dabei war die äußerste Schicht des Kortex (Grenze zur Pia mater) am intensivsten gefärbt. Auch das ventral angrenzende Corpus callosum wies Zellen auf, die positiv für Cx43 mRNA waren. Die Anzahl der Cx43 mRNA-positiven Zellen im contralateralen Kortex war am Tag 7 nicht signifikant verschieden von sham-operierten Tieren (Daten nicht gezeigt). Die quantitative

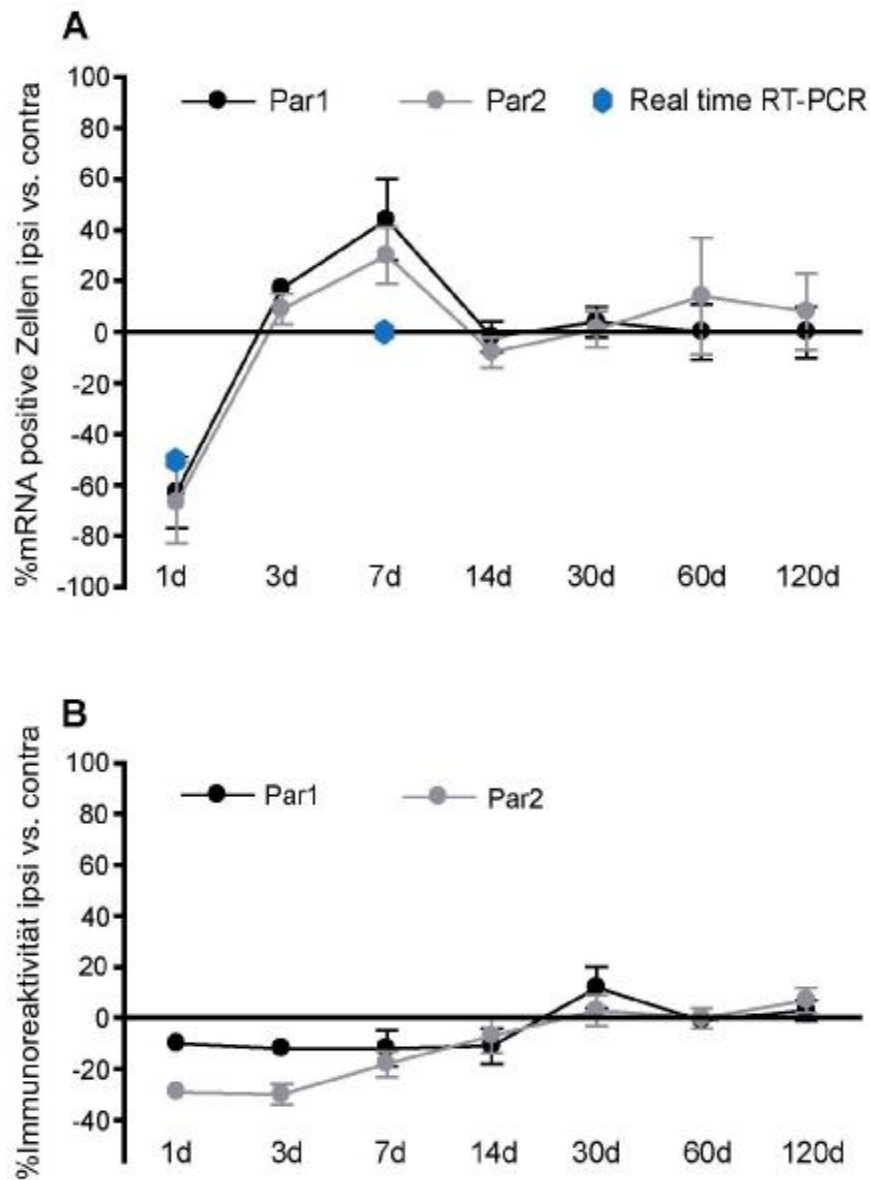


Abb. 12. Quantifizierung von Cx43 mRNA und Protein im somatosensorischen Kortex. **A:** Quantifizierung der Cx43 mRNA positiven Zellen in Par1 und Par2. Die Zahl der Cx43 mRNA exprimierenden Zellen war am Tag 1 in Par1 um 63 % und Par2 um 67 % reduziert. Dagegen war am Tag 3 die Zahl der Cx43 mRNA-positiven Zellen im ipsilateralen somatosensorischen Kortex leicht erhöht (Par1: 17 %, Par2: 9 %) und am Tag 7 deutlich erhöht (Par1: 44 %, Par2: 30 %). Ab Tag 14 war die Zahl der Cx43 mRNA exprimierenden Zellen sowohl Par1 als auch in Par2 gegenüber dem jeweiligen contralateralen homotopen Areal unverändert. Die Unterschiede in der Zellzahl zwischen ipsi- und contralateral sind in % \pm SEM dargestellt. Die real time RT-PCR Studie ergab eine 50 %ige Reduktion der Cx43 mRNA am Tag 1 nach Ischämie, während das Expressionslevel am Tag 7 unverändert war. **B:** Unterschiede in der relativen optischen Dichte der immunhistochemischen Färbung für Cx43. Die Immunreaktivität war in Par1 und Par2 zwischen Tag 1 und Tag 14 nach Photothrombose reduziert (**Par1:** 1d -10 %, 3d -12 %, 7d -12 %, 14d -11 %; **Par2:** 1d -29 %, 3d -30 %, 7d -18 %, 14d -7 %). Ab Tag 30 war die Immunreaktivität im ipsilateralen somatosensorischen Kortex nicht verschieden von contralateral. Die Daten sind als prozentualer Unterschied der ROD's zwischen ipsi- und contralateral in % \pm SEM dargestellt. Par1, primärer somatosensorischer Kortex; Par2, sekundärer somatosensorischer Kortex.

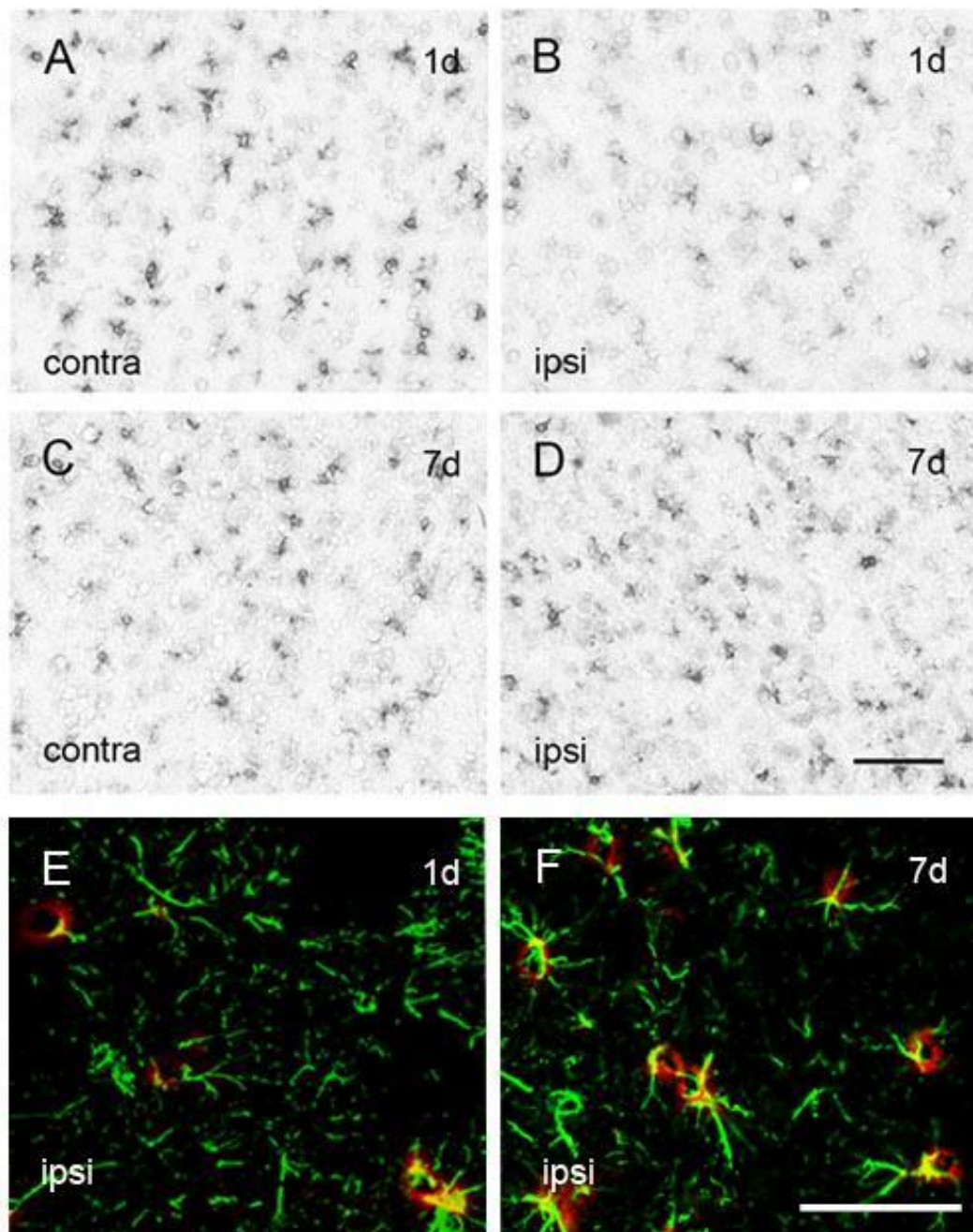


Abb. 13. Connexin 43 mRNA-positive Zellen im primären somatosensorischen Kortex am Tag 1 (A, B, E) und Tag 7 (C, D, F) nach Photothrombose. Am Tag 1 war die Anzahl der Cx43 mRNA exprimierenden Zellen im ipsilateralen Kortex (B) im Vergleich zum homotopen kontralateralen Areal (A) stark reduziert. Dagegen war am Tag 7 die Zahl der Cx43 mRNA-positiven Zellen im ipsilateralen Par1 stark erhöht (D). Konfokale Aufnahmen des somatosensorischen Kortex nach Doppelmarkierung für GFAP (grün) und Cx43 mRNA (rot) am Tag 1 (E) und Tag 7 (F) nach Ischämie. Die stark verringerte Anzahl von Cx43 mRNA exprimierenden Zellen am Tag 1 konnte mit der Fluoreszenz-*in situ* Hybridisierung bestätigt werden (E). Die Doppelmarkierung am Tag 7 zeigte, dass die erhöhte Anzahl von Cx43 mRNA-positiven Zellen mit dem astrozytären Marker GFAP (grün) co-lokalisierte (F). Maßbalken: 100 μ m (A-D), 50 μ m (E,F).

Analyse der *in situ* Signale ergab im ipsilateralen Par1 und Par2 am Tag 1 nach Induktion der Photothrombose eine verminderte Zahl von Zellen, die Cx43 mRNA exprimierten (Par1: -63 %, Par2: -67 % ipsi versus contra, Abb. 12A und 13C, D). Am Tag 3 war die Anzahl der Cx43 mRNA-positiven Zellen leicht erhöht (Par1: 17 %, Par2: 9 %, Abb. 12A). Am Tag 7 war die Zahl der Cx43 mRNA exprimierenden Zellen im ipsilateralen Kortex stark erhöht (Par1: 44 %, Par2: 30 %, Abb. 12A und 13C, D). Von Tag 14 an, bis Tag 120 war die Zahl der Cx43 mRNA-positiven Zellen des ipsilateralen somatosensorischen Kortex gegenüber contralateral unverändert (Abb. 12A). An Hirnschnitten von Tag 1 und Tag 7 wurden zusätzlich Doppelmarkierungen für Cx43 mRNA und den astrozytären Marker GFAP durchgeführt. Mit dieser Färbung konnte die verringerte Zahl der Cx43 mRNA-positiven Zellen am Tag 1 bestätigt werden (Abb. 13E). Die Doppelmarkierung am Tag 7 zeigte, dass auch die erhöhte Anzahl an Cx43 mRNA exprimierenden Zellen mit GFAP co-lokalisiert (Abb. 13F).

Am Tag 1 und Tag 7 wurde die Expression von Cx43 mRNA zusätzlich mit real time RT-PCR untersucht. Die Analyse am Tag 1 ergab eine 50 %ige Reduktion des mRNA Levels im ipsilateralen somatosensorischen Kortex im Vergleich zu contralateral (Abb. 12A). Das Expressionslevel von Cx43 mRNA war am Tag 7 im ipsilateralen somatosensorischen Kortex nicht verschieden von contralateral (Abb. 12A).

Connexin 43 Protein im somatosensorischen Kortex

Zur semiquantitativen Analyse der Immunreaktivität nach Ischämie wurde die relative optische Dichte mit dem Programm „Scion Image“ bestimmt. Die Daten der Tiere, die am Tag 7 nach Photothrombose untersucht wurden, wurden zusätzlich mit sham-operierten Tieren verglichen. Dabei zeigte sich, dass die Immunreaktivität von Cx43 in der contralateralen Hemisphäre nicht verschieden von der Expression in den sham-Tieren war (Daten nicht gezeigt). Sowohl Par1 als auch Par2 der läsierten Hemisphäre zeigten von Tag 1 bis Tag 14 nach Photothrombose eine verringerte Immunreaktivität (Par1: 1d -10 %, 3d -12 %, 7d -12 %, 14d -11 %; Par2: 1d -29 %, 3d -30 %, 7d -18 %, 14d

-7 %, ipsi versus contra; Abb. 12B und 14A, B). Anhand dieser Resultate wird deutlich, dass sich funktionell verschiedene Areale in der Reaktion auf einen fokalen Infarkt unterscheiden. Ab Tag 30 bis Tag 120 war die Expression von Cx43 in Par1 und Par2 nicht verschieden von der Expression in homotopen contralateralen Arealen (Abb. 12B).

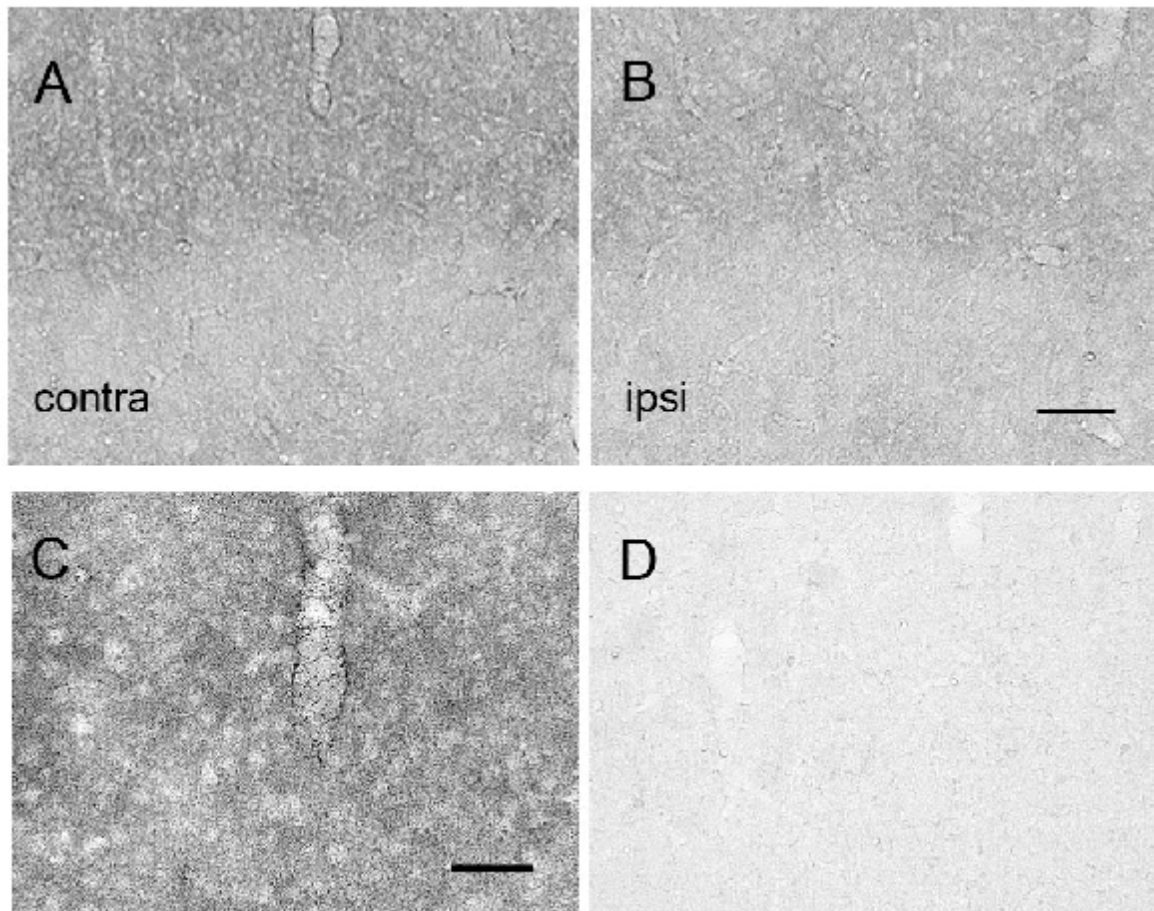


Abb. 14. Connexin 43 Protein im zerebralen Kortex am Tag 7 nach Ischämie. Repräsentative Aufnahmen aus Schicht IV und V der contralateralen (A) und ipsilateralen (B) Hemisphäre. Die Immunreaktivität war im ipsilateralen Par1 sichtlich verringert. Abbildung (C) zeigt ein hochauflösendes Bild des typischen Cx43 Färbemusters im zerebralen Kortex. Die Aufnahme eines Kontroll-Hirnschnittes, bei dem nur mit dem sekundären Antikörper beprobt wurde, ist in (D) zu sehen.
Maßbalken: 100 µm (A, B, D); 50 µm (C).

Connexin 43 mRNA Expression im Hippokampus

Connexin 43 mRNA-positive Zellen waren in allen hippocampalen Strata vorzufinden. Das Hybridisierungssignal der positiven Zellen im Hippokampus war intensiver als im zerebralen Kortex. Dies ist ein Indikator dafür, dass das zelluläre Level der Cx43 mRNA im Hippokampus höher ist als im Kortex.

Die quantitative Analyse des Hippokampus ergab minimale temporäre Schwankungen in der Zahl der Cx43 mRNA exprimierenden Zellen (Abb. 17A). Die Zellzahlen des contralateralen Hippokampus waren am Tag 7 nicht signifikant verschieden von denen der sham-operierten Tiere (Daten nicht gezeigt). Die Auswertung der einzelnen Strata am Tag 7 zeigte eine stabile Zellzahl in allen Strata mit Ausnahme des Stratum Oriens der CA1. Dies ist auch der Bereich des Hippokampus, in dem reaktive Astrozyten mittels Immunfärbungen für GFAP gezeigt werden konnten (Abb. 6B). Die Analyse aller anderen Zeitpunkte beschränkte sich bezüglich des Hippokampus ausschließlich auf das Stratum Oriens. Einen Tag nach Photothrombose war die Zahl der Cx43 mRNA exprimierenden Zellen im ipsilateralen Stratum Oriens um 50 % reduziert (Abb. 17A). Von Tag 3 bis Tag 14 war die Zellzahl hingegen merklich erhöht (3d: 65 %, 7d: 35 %, 14d: 33 %, ipsi versus contra, Abb. 15 und 17A). In diesem Zeitraum zeigten die Zellen im Stratum Oriens ein deutlich intensiveres Hybridisierungssignal als im übrigen Hippokampus (Abb. 15). Ab Tag 30 war die Anzahl Cx43 mRNA exprimierender Zellen wieder auf dem Normalniveau (Abb. 17A). Die Eingangs beschriebenen minimalen Schwankungen der Cx43 mRNA-positiven Zellen im Hippokampus reflektierten vermutlich die Veränderungen im Stratum Oriens.

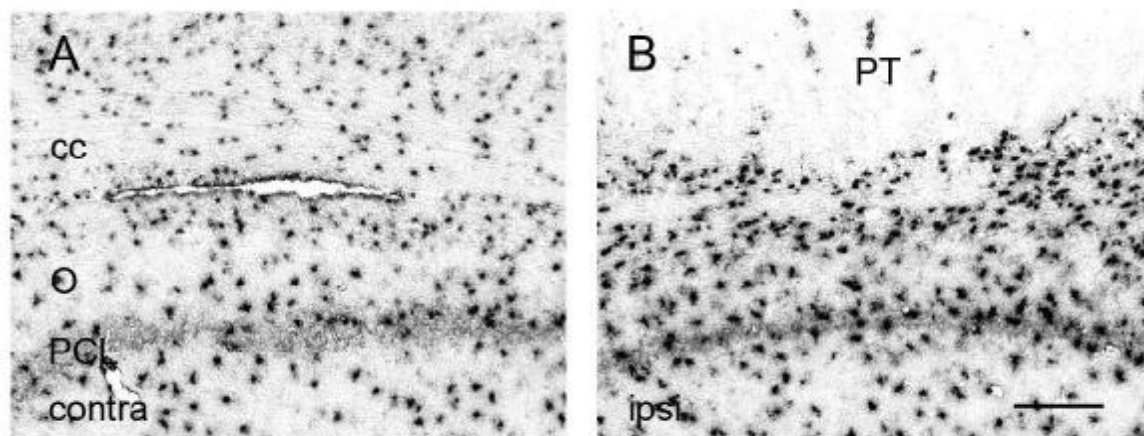


Abb. 15. Connexin 43 mRNA-positive Zellen im Stratum Oriens am Tag 3 nach Induktion der Ischämie. Die Anzahl der positiven Zellen war im ipsilateralen Stratum Oriens (B) verglichen mit contralateral (A) erhöht.

PCL, pyramidal cell layer; PT, Photothrombose; O, Stratum Oriens; Cc, Corpus callosum. Maßbalken: 200 µm (A und B).

Connexin 43 Protein im Hippokampus

Die immunhistochemische Färbung (DAB Methode) für Cx43 wurde mittels Lichtmikroskopie analysiert. Das Färbemuster für Cx43 im Hippokampus wies die für den Kortex beschriebenen Charakteristika auf und stimmte mit der in der Literatur beschriebenen Expression überein (Yamamoto et al., 1990).

Die semiquantitative Analyse der Immunreaktivität zeigte minimale temporäre Veränderungen im Hippokampus (Abb. 17B). Die Daten der einzelnen Strata am Tag 7 wurden mit den Daten der sham-operierten Tiere verglichen und zeigten keine signifikanten Veränderungen (Daten nicht gezeigt). Die Auswertung der einzelnen Strata ipsi versus contra am Tag 7 ergab eine stabile Immunreaktivität mit Ausnahme des Stratum Oriens der CA1 (die detaillierten Daten dazu sind Teil einer medizinischen Doktorarbeit unserer Arbeitsgruppe). Das Stratum Oriens war der Bereich des

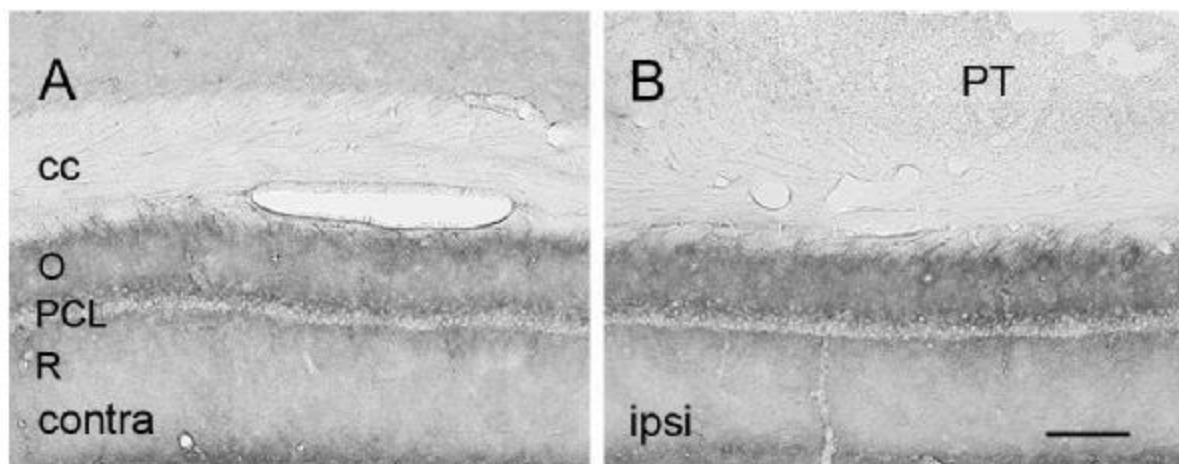


Abb. 16. Connexin 43 Immunfärbung im Stratum Oriens am Tag 7 nach Induktion der Photothrombose. Die Immunreaktivität war im ipsilateralen Stratum Oriens (**B**) im Vergleich zu contralateral (**A**) erhöht.

PCL, pyramidal cell layer; PT, Photothrombose; O, Stratum Oriens; R, Stratum Radiatum; Cc, Corpus callosum. Maßbalken 200 μ m (A und B).

Hippokampus, der reaktive Astrozyten mit erhöhter Immunreaktivität für GFAP enthielt (Abb. 6B). Die Analyse bezüglich des Hippokampus beschränkte sich an den anderen Zeitpunkten auf das Stratum Oriens. Die Immunreaktivität für Cx43 war von Tag 1 bis Tag 120 gegenüber dem contralateralen Stratum Oriens erhöht (1d: 19 %, 3d: 25 %, 7d: 19 %, 14d: 28 %, 30d: 31 %, 60d: 19 %, 120d: 10 %; Abb. 16 und 17B). Anhand des

Graphen (Abb. 17B) wird deutlich, dass die minimalen Schwankungen der Immunreaktivität im Hippokampus wahrscheinlich die Veränderungen im Stratum Oriens widerspiegeln.

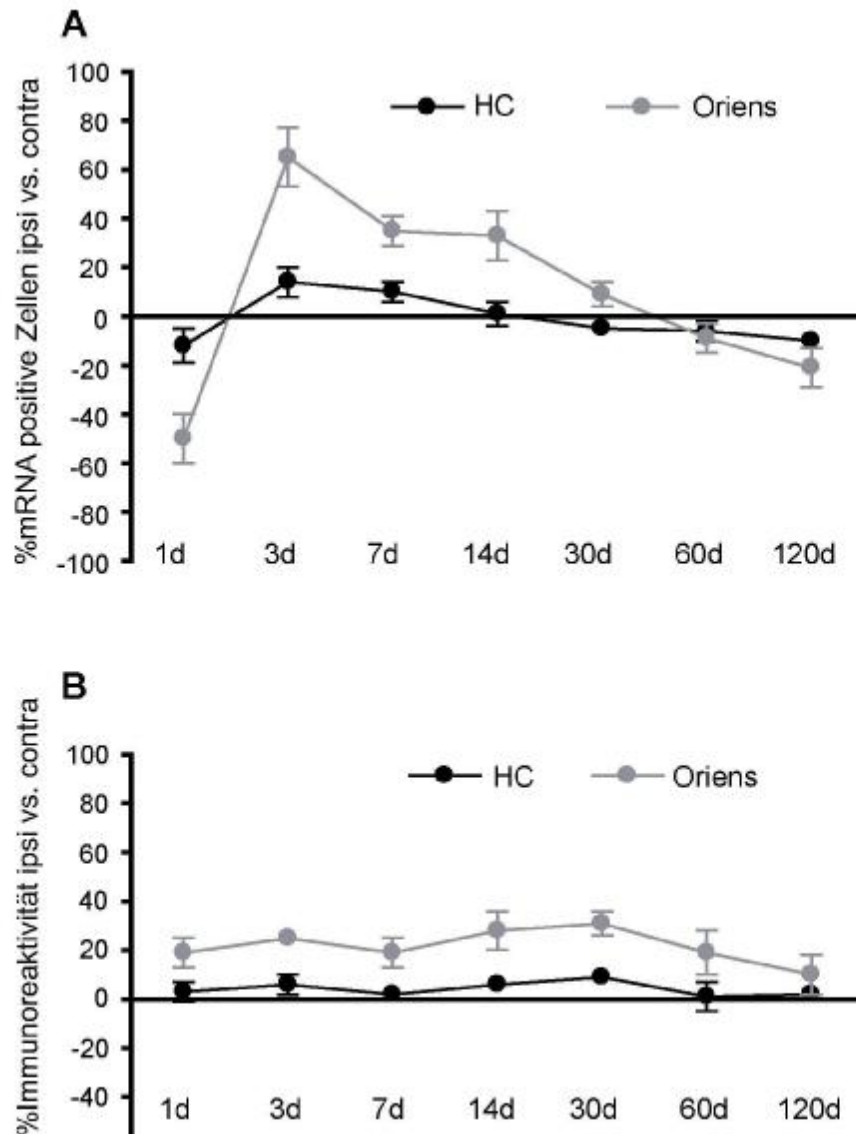


Abb. 17. Quantifizierung von Cx43 mRNA und Protein im Hippokampus. **A:** Die Auswertung der Cx43 mRNA exprimierenden Zellen zeigte minimale Schwankungen im HC. Im ipsilateralen Stratum Oriens war die Zahl der Cx43 mRNA-exprimierenden Zellen am Tag 1 um 50 % reduziert. Ab Tag 3 bis Tag 14 war die Anzahl der Cx43 mRNA-exprimierenden Zellen im Stratum Oriens sichtlich erhöht (3d: 65 %, 7d: 35 %, 14d: 33 %). Die Darstellung der Daten erfolgte als prozentualer Unterschied der Zellzahl zwischen ipsi- und contralateral in % \pm SEM. **B:** Die Auswertung der ROD zeigte minimale Schwankungen in der Immunreaktivität des HC. Im Stratum Oriens war die Immunreaktivität über den gesamten Untersuchungszeitraum erhöht (1d: 19 %, 3d: 25 %, 7d: 19 %, 14d: 28 %, 30d: 31 %, 60d: 19 %, 120d: 10 %). Die Daten sind als prozentualer Unterschied der ROD's zwischen ipsi- und contralateral in % \pm SEM dargestellt. Oriens, Stratum Oriens; HC, Hippokampus.

Diskussion

Glianarbe

Die vorliegende Arbeit beschreibt das räumlich-zeitliche Expressionsmuster von GFAP, Cx43 mRNA und Protein in der Glianarbe nach einer photothrombotisch induzierten Ischämie in der Ratte. Der die Läsion flankierende zerebrale Kortex zeigte eine gleichzeitige Heraufregulation von GFAP (indiziert reaktive Astrozyten), Cx43 mRNA und Protein. Ab Tag 14 nach Induktion der Photothrombose war ein Band aus reaktiven Astrozyten am Boden der Läsion zu beobachten, in dem die Zellen erhöhte Cx43 mRNA und Protein exprimierten. Zur gleichen Zeit war ein Zellstrom zwischen dem lateralen Ventrikel und der Läsion sichtbar, in dem Zellen auch ein erhöhtes Maß an GFAP, Cx43 mRNA und Protein Expression zeigten. Reaktive Astrozyten, die die Läsion umhüllten, besonders im Band am Boden der Läsion und im Strom zwischen dem lateralen Ventrikel und der Läsion, waren nachweislich proliferativ aktiv und exprimierten das Intermediärfilament Nestin. Die vorgelegte Arbeit liefert erste Hinweise dafür, dass Cx43 an der Bildung der Glianarbe, besonders der Proliferation und Migration der reaktiven Astrozyten, beteiligt ist.

Die Bildung einer Glianarbe ist ein dynamischer Prozess, bei dem unter anderem Astrozyten aktiviert werden und charakteristische Eigenschaften, wie Hypertrophie und die Heraufregulation von intermediären Filamenten, aufweisen. Es konnte gezeigt werden, dass verschiedenste Verletzungen des ZNS zur Bildung einer Glianarbe führen (Aronica et al., 2001; Schroeter et al., 1995; Sohl et al., 2000). Nach einer durch Photothrombose induzierten ischämischen Läsion wurde bereits von Schröter (1995) gezeigt, dass Astrozyten in der unmittelbaren Umgebung der Läsion von Tag 3 bis 10 Wochen danach eine erhöhte Expression von GFAP aufwiesen. In der vorliegenden Studie konnte dieses räumlich-zeitliche Muster von reaktiven Astrozyten in der unmittelbaren Umgebung der Läsion bestätigt werden.

Hier konnte außerdem gezeigt werden, dass reaktive Astrozyten, die nach einer fokalen Ischämie eine erhöhte Expression von GFAP aufwiesen, auch eine gesteigerte Expression von Cx43 mRNA und Protein zeigten. Eine ähnliche Heraufregulation von Cx43 konnte in unserer Arbeitsgruppe auch nach einer MCAO (middle cerebral artery occlusion, unveröffentlichte Daten) nachgewiesen werden. Im Tiermodell für eine globale Ischämie zeigten Astrozyten im gliotischen Gewebe über einen längeren Zeitraum eine erhöhte Immunreaktivität für Cx43 (Hossain et al., 1994b). Rohlmann und Kollegen (1993) beschrieben eine ähnliche Heraufregulation der Immunreaktivität für Cx43 in Astrozyten, die läsionierte Motoneurone umgaben. Des weiteren wurde eine Heraufregulation von Cx43 auch in gliotischen Bereichen in humanem epileptischen Hirngewebe gefunden (Aronica et al., 2001; Fonseca et al., 2002; Naus et al., 1991). Die erhöhte Expression von Cx43 in reaktiven Astrozyten ist vermutlich kein ischämie-spezifisches Resultat, sondern eher ein durch die Narbenbildung hervorgerufener Mechanismus. Nach verschiedenen pathologischen Ereignissen, die zu einer Aktivierung der Astrozyten führen, ist die Erhöhung der Cx43 Expression zu beobachten.

Die gleichzeitige Heraufregulation von Cx43 mRNA und Protein in reaktiven Astrozyten war im Corpus callosum unmittelbar unterhalb der Läsion nicht vorzufinden. Reaktive Astrozyten dort zeigten zwar eine erhöhte Expression von GFAP und Cx43 mRNA aber eine unveränderte Immunreaktivität für Cx43. Daher stellt sich die Frage, inwiefern sich Astrozyten im Corpus callosum von denen im zerebralen Kortex unterscheiden. Wie schon ausführlich in der Einleitung beschrieben, können Astrozyten in protoplasmatischen und fibrösen Typ unterteilt werden. Während protoplasmatische Astrozyten hauptsächlich in der Grauen Substanz vorzufinden sind, findet man fibröse Astrozyten eher in der weißen Substanz (Panickar and Norenberg, 2005). Astrozyten sind aber auch nach funktionellen Aspekten unterteilbar (Hansson, 1988; Wilkin et al., 1990). Zum Beispiel propagieren Astrozyten Kalziumwellen im zerebralen Kortex, Hippokampus und Corpus callosum auf unterschiedliche Art und Weise, entweder abhängig oder unabhängig von Cx43 (Haas et al., 2005; Schipke et al., 2002). Daher ist es denkbar,

dass verschiedene Typen von Astrozyten unterschiedlich auf Verletzungen des Gehirns reagieren.

Astrozyten im Zellband am Boden der Läsion waren nach Induktion der Ischämie proliferativ aktiv, wie mittels Inkorporation von BrdU gezeigt werden konnte. In der Literatur ist eine solche Teilungsaktivität von reaktiven Astrozyten in der näheren Umgebung einer Hirnverletzung beschrieben (Lee et al., 2003; Liu and Chen, 1994; Norenberg, 2005). Connexin 43-positive reaktive Astrozyten im Zellstrom zwischen dem lateralen Ventrikel und der Läsion zeigten auch ein hohes Maß an BrdU Inkorporation. Es ist daher nahe liegend, dass diese Zellen ursprünglich aus der Subventrikulärzone (SVZ) des lateralen Ventrikels stammen, eine im adulten Hirn bekannte germinale Nische, und in Reaktion auf den ischämischen Infarkt generiert wurden. Eine Studie von Goings (2004) unterstützt diese Vermutung. In dieser Arbeit wurden retrovirale Vektoren direkt nach einer Verletzung des zerebralen Kortex in den lateralen Ventrikel injiziert. Es konnte gezeigt werden, dass retroviral-markierte Zellen sowohl ins Corpus callosum als auch in den verletzten zerebralen Kortex migrierten. Eine Vielzahl dieser markierten Zellen konnte als Glia identifiziert werden (Goings et al., 2004). Die Region des posterioren Periventrikels (pPV) wird in der Literatur als eine weitere mögliche Quelle für neu gebildete Zellen im adulten Gehirn beschrieben (Chechneva et al., 2005; Nakatomi et al., 2002). Reaktive Astrozyten, die an der Bildung der Glianarbe beteiligt sind, haben entweder in der unmittelbaren Umgebung der Läsion proliferiert oder sind von der SVZ oder dem pPV stammend zur Läsion gewandert. Die hier diskutierten Ergebnisse lassen vermuten, dass die Bildung der Glianarbe und speziell die Proliferation und Migration von Astrozyten durch Cx43 vermittelte interzelluläre Kommunikation unterstützt wird.

Nach einer fokalen Ischämie scheint die Teilungsaktivität von Astrozyten in unterschiedlichen Gebieten unterschiedlich ausgeprägt zu sein. Während reaktive Astrozyten im Zellband am Boden der Läsion und im Strom von Zellen zwischen dem lateralen Ventrikel und der Läsion ein hohes Maß an BrdU Inkorporation zeigten, war die Teilungsaktivität im kortikalen gliotischen Gewebe eher gering. Nach verschiedensten

Verletzungen im Gehirn repräsentiert die Population an teilungsaktiven Astrozyten 1 % bis 46 % der reaktiven Astrozyten (Bochelen et al., 1995; Krushel et al., 1995; Miyake et al., 1988). In der hier vorgelegten Arbeit wurden 50 % der BrdU-positiven Zellen im Band am Boden der Läsion durch Co-Lokalisation mit S100 β (ein Marker für reife und reaktive Astrozyten) als Astrozyten identifiziert. Bei den S100 β -negativen, BrdU-positiven Zellen handelt es sich vermutlich um aktivierte Mikroglia und Makrophagen sowie um immature Gliazellen. Es konnte allerdings ausgeschlossen werden, dass es sich bei diesen Zellen um Neurone handelte. Wenn Nukleotid-Analoga benutzt werden, hängt die Variabilität in der Anzahl von markierten Zellen von (i) der verabreichten Menge, (ii) dem Verabreichungszeitpunkt, (iii) dem Untersuchungszeitpunkt nach Gabe und (iv) der untersuchten Hirnregion ab. In der vorliegenden Studie stellen die teilungsaktiven Zellen in den kortikalen Arealen, welche die Läsion flankieren, wahrscheinlich den kleinen Teil Astrozyten dar, die in der Lage sind, sich vor Ort zu teilen. Die reaktiven Astrozyten im Band am Boden der Läsion zeigten dagegen ein hohes Maß an Teilungsaktivität. Ein Teil der am Boden der Läsion nachgewiesenen reaktiven Astrozyten hatte sich wahrscheinlich vor Ort geteilt, ein anderer Teil ist entweder von der SVZ oder dem pPV eingewandert.

Reaktive Astrozyten in der unmittelbaren Umgebung der Läsion exprimierten auch das intermediäre Filament Nestin. Während der Embryonalentwicklung wird dieses Filament von multipotenten neuroepithelialen Stammzellen exprimiert und während der Maturation durch GFAP ersetzt (Duggal et al., 1997; Sahin et al., 1999). Es konnte jedoch auch gezeigt werden, dass Nestin nach verschiedenen Verletzungen des ZNS von reaktiven Astrozyten exprimiert wurde (Ernst and Christie, 2006; Li and Chopp, 1999). Die Reexpression des embryonalen Filaments Nestin in reaktiven Astrozyten könnte ein Indikator für Reorganisation und Plastizität nach einer Ischämie sein.

Eine fokale Ischämie nimmt, wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, Einfluss auf die Expression von Cx43. Reaktive Astrozyten der Glianarbe zeigten über den Untersuchungszeitraum (bis 60 Tage nach Ischämie) eine erhöhte Expression für Cx43 mRNA und Protein. Das ab Tag 14 nachgewiesene Zellband am Boden der Läsion

und der Zellstrom zwischen dem lateralen Ventrikel und der Läsion wiesen eine hohe Anzahl an teilungsaktiven reaktiven Astrozyten auf, die eine erhöhte Expression für Cx43 zeigten. Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse bieten erste Hinweise dafür, dass Cx43 an der Bildung der Glianarbe, speziell der Proliferation und Migration von Astrozyten beteiligt ist. Untersuchungen an Kulturen von neuronalen Progenitorzellen konnten zeigen, dass Cx43 während der Entwicklung die Proliferation, Differenzierung und Migration beeinflusste (Cheng et al., 2004; Duval et al., 2002; Scemes et al., 2003). Neuronale Progenitorzellen von Cx43 defizienten (Cx43 $-/-$) Tieren zeigten eine verringerte Expression des purinergen Rezeptors P2Y₁ und darauf zurückzuführende Veränderungen der interzellulären Kalziumwellen (Scemes et al., 2003). Wenn Wildtyp-Kulturen mit Antagonisten des P2Y₁ Rezeptors inkubiert wurden, zeigten diese eine verringerte Proliferation und Migration (Scemes et al., 2003). Es ist daher denkbar, dass eine erhöhte Expression von Cx43 zu einer erhöhten Expression von bestimmten Purinrezeptoren führt und somit einen Einfluss auf die interzelluläre Kommunikation über Kalziumwellen hat, welche wiederum die Proliferation und Migration beeinflussen. Weiterführende Projekte der vorgelegten Arbeit sollten daher die Expression von purinergen Rezeptoren berücksichtigen und könnten somit zur Klärung zu Grunde liegender Mechanismen beitragen.

Die vorgelegte Arbeit bietet Hinweise dafür, dass die Zellen im Band am Boden der Läsion, in der SVZ oder dem pPV nach Ischämie gebildet wurden und in die Läsion einwanderten. Ein Beleg dafür ist der Zellstrom zwischen dem lateralen Ventrikel und der Läsion. Die Markierung mit Nukleotid-Analoga kann keinen eindeutigen Nachweis für den Ursprung der Zellen bieten. Eine Injektion von retroviralen Vektoren in den lateralen Ventrikel nach Induktion der Ischämie würde es ermöglichen, die Migration von neu gebildeten Zellen eindeutig zu verfolgen.

Ist die Erhöhung von Cx43 essentiell für die Bildung der Glianarbe? Um dieser Frage nachzugehen, wäre es vielversprechend, (i) gap junction Blocker nach Induktion der Ischämie zu applizieren, (ii) mit siRNA die post-ischämische Translation zu minimieren

oder (iii) Tiere zu verwenden, deren Astrozyten Cx43 defizient sind. Ist die Erhöhung von Cx43 für die Glianarbe von Vorteil? Einen interessanten Aspekt liefert eine Studie zum Wundheilungsprozess nach Hautschnitten (Qiu et al., 2003). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Applikation eines Cx43-antisense-Gels (enthielt antisense Oligonukleotide gegen Cx43) die Expression von Cx43 stark reduzierte und zu einer beschleunigten Wundheilung und einer makroskopisch unauffälligeren Narbe führte. Dagegen zeigten Tiere mit Cx43 defizienten Astrozyten nach Ischämie ein größeres Infarktvolumen und erhöhte Inflammation und Apoptose im angrenzenden Gebiet (Nakase et al., 2004). Die Frage, ob Cx43 einen positiven oder negativen Effekt hat, bleibt somit immer noch unbeantwortet.

Connexin 43 Expression in „remote“ Arealen

Die vorgelegte Studie beschreibt das Expressionsprofil von Cx43 mRNA und Protein im somatosensorischen Kortex und Hippokampus der Ratte nach photothrombotisch induzierter Ischämie. Der transiente Anstieg von Cx43 mRNA-positiven Zellen im somatosensorischen Kortex der ipsilateralen Hemisphäre wurde von einer gleichzeitigen Reduktion in der Immunreaktivität für das zugehörige Protein begleitet. Untersuchungen der einzelnen hippokampalen Strata zeigten ausschließlich im Stratum Oriens direkt unter der Läsion eine erhöhte Anzahl an Cx43 mRNA-positiven Astrozyten, die gleichzeitig eine Erhöhung der Immunreaktivität für Cx43 Protein aufwiesen.

Connexin 43 mRNA Expression

Einen Tag nach Induktion der Ischämie war die Zahl der Cx43 exprimierenden Zellen im ipsilateralen zerebralen Kortex stark verringert. Bereits am Tag 3 war die Anzahl der Cx43 mRNA-positiven Zellen im somatosensorischen Kortex leicht erhöht, wogegen sich am Tag 7 eine starke Erhöhung der Zellzahl zeigte. Ab Tag 14 nach Induktion der Ischämie war die Zahl der Cx43 mRNA-positiven Zellen gegenüber der contralateralen Seite unverändert. Die erhöhte Anzahl an Cx43 mRNA exprimierenden Zellen konnte durch Doppelmarkierung mit GFAP als Astrozyten identifiziert werden.

Die hier vorgelegten Daten zeigen, dass Astrozyten im ipsilateralen somatosensorischen Kortex nach einer Ischämie im Hinterpfotenareal Veränderungen unterliegen. Einen Tag nach Ischämie konnten im ipsilateralen somatosensorischen Kortex nur sehr wenige Zellen detektiert werden, die Cx43 mRNA exprimieren. Die real time RT-PCR Untersuchung zu diesem Zeitpunkt bestätigte die stark reduzierte Expression der Cx43 Transkripte. Ein stark vermindertes Cx43 mRNA Expressionslevel wurde auch einen Tag nach MCAO beschrieben (Li et al., 2005). Offensichtlich ist die Transkription von Cx43 unmittelbar nach einer fokalen Ischämie gestört. Am Tag 7 nach Induktion der Photothrombose war die Zahl der Cx43 mRNA-positiven Zellen im ipsilateralen somatosensorischen Kortex erhöht, allerdings zeigten die real time RT-PCR Studien zu diesem Zeitpunkt ein unverändertes Expressionslevel. Daher stellt sich die Frage nach den Ursachen für diese offensichtlich gegensätzlichen Resultate. Eine Möglichkeit ist die Expression von Splice-Varianten nach Ischämie, die zwar mit der Ribosonde erfasst wurden, in der PCR Reaktion aber undetektiert blieben.

Es ist bekannt, dass nach einer photothrombotisch induzierten Ischämie Astrozyten des gesamten ipsilateralen Kortex aktiviert werden, in den reaktiven Status übergehen und dabei die Expression von GFAP erhöhen (Schroeter et al., 1995). Immunhistochemische Färbungen für GFAP an Hirnschnitten der vorliegenden Studie konnten dies bestätigen. Wir vermuten, dass Astrozyten, welche vor der photothrombotisch induzierten Ischämie Cx43 mRNA nicht nachweisbar exprimierten, die Expression der Transkripte im reaktiven Status erhöhen. Potentielle Kandidaten dafür sind eine Subpopulation von Astrozyten, die im gesunden Gehirn kein Cx43 exprimieren (Wallraff et al., 2004). Es ist außerdem denkbar, dass zu einem geringen Prozentsatz Astrozyten aus der SVZ in den ipsilateralen Kortex eingewandert sind. Goings und Kollegen (2004) haben unmittelbar nach einer Verletzung im zerebralen Kortex retrovirale Vektoren in den lateralen Ventrikel injiziert. Sie konnten zeigen, dass retroviral-markierte Zellen in den ipsilateralen Kortex einwanderten und diese vorwiegend als Gliazellen identifizieren. In der Literatur ist außerdem beschrieben, dass sich reaktive Astrozyten

nach einer Verletzung des Gehirns vor Ort teilen können (Lee et al., 2003; Norenberg, 2005). Ernst und Christie (2006) konnten zeigen, dass proximale Astrozyten nach einer Verletzung des Kortex den Marker Ki-67 exprimierten. Dieser ist ein Marker für die Teilungsaktivität von Zellen. Die erhöhte Anzahl an Cx43 mRNA-positiven Zellen nach Photothrombose ist somit größtenteils auf die Heraufregulation von Transkripten und nur zu einem geringen Teil auf die „Vor-Ort-Proliferation“ zurückzuführen. Die Migration von Zellen aus der SVZ spielt vermutlich eine untergeordnete Rolle.

Die Untersuchungen des Hippokampus zeigten, dass post-ischämische Veränderungen ausschließlich im Stratum Oriens unterhalb der Läsion stattfanden. Einen Tag nach Induktion der Ischämie war die Zahl der Cx43 mRNA exprimierenden Zellen stark verringert, während sie zwischen Tag 3 und 14 erhöht vorgefunden wurde. Während dieses Zeitraumes wiesen die Astrozyten des Stratum Oriens auch einen erhöhten zellulären Level an Cx43 mRNA auf. Das Stratum Oriens war der Bereich des Hippokampus, in dem mittels GFAP Immunfärbung reaktive Astrozyten gezeigt werden konnten. Es ist daher möglich, dass dieser Bereich des Hippokampus in die Glianarbenbildung einbezogen war. Dieser Sachverhalt soll im Abschnitt *Connexin 43 Immunreaktivität* ausführlicher diskutiert werden.

Connexin 43 Immunreaktivität

Der ipsilaterale somatosensorische Kortex zeigte von Tag 1 bis Tag 14 nach Induktion der Ischämie eine verringerte Immunreaktivität. Ab Tag 30 bis Tag 120 war die Immunreaktivität im ipsilateralen somatosensorischen Kortex nicht mehr verschieden von contralateral homotopen Arealen.

Der für die immunhistochemischen Studien verwendete Antikörper gegen Cx43 (Firma Zymed) detektiert Cx43 unabhängig vom Phosphorylierungsstatus. Connexin 43 Protein liegt im gesunden Hirn mehrfach phosphoryliert vor, unterliegt aber post mortem einer raschen Dephosphorylierung (Hossain et al., 1994a). Li und Kollegen (1998) konnten zeigen, dass Perfusionsfixierung mit PFA die post mortem Dephosphorylierung stark einschränkt. Daher wurde für die hier vorliegende Studie diese empfohlene Fixierung

gewählt. Die hier beschriebene Reduktion der Immunreaktivität ist somit auf einen Abbau der Proteine bzw. eine verminderte Proteinsynthese zurückzuführen und weniger auf einen veränderten Phosphorylierungsstatus. Duffy und Kollegen (2004) konnten zeigen, dass intrazelluläre Azidifizierung, ein Vorgang, der auch nach einer Ischämie stattfindet (Yokota et al., 2000), zu einer Verlagerung des Cx43 Proteins ins Zytoplasma und schließlich zum Abbau des Proteins führt. Die in der Literatur beschriebene Reduktion von Cx43 Protein nach MCAO stützt die hier vorgelegten Ergebnisse (Li et al., 1998; Li et al., 2005). Nach Verletzungen des Rückenmarks zeigt die veränderte Expression von Cx43 einen ähnlichen Verlauf (Theriault et al., 1997). Hier war 7 Tage nach einer akuten Verletzung durch Kompression in einer weiten Zone um die initiale Verletzungsstelle kein Cx43 Protein detektierbar. Die Wellen der Peri-Infarkt-Depolarisationen, welche nach einer kortikalen Ischämie über den gesamten ipsilateralen Kortex laufen, werden als eine Ursache für veränderte Translationsmechanismen gesehen (Hossmann, 1999; Kawahara et al., 1999; Mies, 1993). Wie in diesem Abschnitt diskutiert, gibt es verschiedene Studien, die zeigen, dass die Expression von Cx43 nach Verletzungen des ZNS temporäre Störungen aufweist. Die zugrunde liegenden Mechanismen sind allerdings noch nicht vollständig aufgeklärt.

Connexin 43 Protein ist in unterschiedlichem Maße in Par1 und Par2 reguliert. Dies zeigt, dass sich funktionell verschiedene Areale in ihrer post-ischämischen Reaktion unterscheiden. Ausgeprägte post-ischämische Effekte in weiter entfernt liegenden Arealen könnten zum Beispiel durch Deafferenzierung hervorgerufen werden. Dieses Phänomen wird als Diaschisis bezeichnet und wurde bereits 1914 von von Monakow beschrieben (zusammenfassende Überarbeitung in Finger et al., 2004; von Monakow, 1914).

Im Stratum Oriens des Hippokampus war die Immunreaktivität für Cx43 über einen längeren Zeitraum nach Photothrombose erhöht. In diesem Bereich des Hippokampus zeigten reaktive Astrozyten mit erhöhter Expression von GFAP auch eine erhöhte Expression von Cx43 mRNA. Da die hippokampalen Veränderungen nach fokaler kortikaler Ischämie ausschließlich im Stratum Oriens unterhalb der Läsion vorzufinden

waren, ist es denkbar, dass Moleküle, die eine Aktivierung der Astrozyten auslösten, vom Infarktkern bis in das Stratum Oriens diffundiert waren. Es ist daher möglich, dass das Stratum Oriens aufgrund der Lokalisation zur ischämischen Läsion in die Bildung der Glianarbe einbezogen ist.

Funktionelle Zusammenhänge

Im letzten Abschnitt der Diskussion sollen die Ergebnisse der Expressionsstudien in einem funktionellen bzw. physiologischen Kontext betrachtet werden.

Die in der vorliegenden Studie beschriebene Reduktion der Cx43 Immunreaktivität erscheint in Anbetracht der erhöhten Anzahl an Cx43 mRNA-positiven Zellen im selben Kortexareal widersprüchlich. Die mRNA Stabilität und die Halbwertszeit von Proteinen scheinen in Reaktion auf verschiedene Stresszustände verändert. Unter pathophysiologischen Bedingungen findet man die Regulation der mRNA Expression und die des zugehörigen Proteins nicht immer in die gleiche Richtung verlaufend. So konnte bereits in anderen Studien nach Photothrombose gezeigt werden, dass bezüglich der GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten (Neumann-Haefelin et al., 1998; Neumann-Haefelin et al., 1999) und des neuronalen GABA-Transporters GAT (Frahm et al., 2004) eine gegensätzliche Regulation für mRNA und Protein vorlag.

Die in der vorliegenden Studie beschriebene Reduktion der Cx43 Immunreaktivität lässt eine transient gestörte Kopplung der betroffenen Zellen nach Photothrombose vermuten. Gestützt wird diese Vermutung durch Untersuchungen an Astrozyten-Zellkulturen von heterozygoten Cx43 +/- Mäusen, in denen gezeigt werden konnte, dass die verringerte Immunreaktivität für Cx43 mit einer reduzierten Kopplung einhergeht (Naus et al., 1997; Siushansian et al., 2001). Allerdings besteht die Möglichkeit, dass Connexin 30, welches auch in Astrozyten exprimiert wird (Dahl et al., 1996; Nagy et al., 1999), funktionell das durch die Ischämie reduzierte Cx43 kompensiert. Studien an Astrozyten-Zellkulturen von homozygoten Cx43 -/- knock out Tieren zeigten jedoch, dass diese Zellen trotz erhöhter Immunreaktivität für Cx30, keine Kopplung aufwiesen (Naus et al., 1997). Connexin 30 scheint also nicht in der Lage zu sein, das fehlende Cx43 funktionell zu

kompensieren (Nakase et al., 2003a; Siushansian et al., 2001). Es wird weiterhin angenommen, dass eine reduzierte gap junction vermittelte Kopplung zu einem gestörten „spatial buffering“ führt. Wie in der Einleitung ausführlich erläutert, sind Astrozyten maßgeblich daran beteiligt, die Homeostase des Extrazellulärspaces aufrecht zu erhalten. Auf diese Weise werden Neurone vor oxidativem Stress geschützt. Demzufolge ist eine gestörte Kopplung der Astrozyten schädlich für das Gehirn und kann maßgeblich zur sekundären Schädigung von ursprünglich intaktem Gewebe beitragen. Diese Behauptung wird gestützt durch Untersuchungen an sowohl heterozygoten Cx43 +/- knock out Tieren (Nakase et al., 2003a; Siushansian et al., 2001) als auch an Tieren, bei denen Cx43 ausschließlich in den Astrozyten eliminiert wurde (Nakase et al., 2004). Diese Studien zeigten, dass Tiere mit verringerter Cx43 Expression bzw. fehlendem Cx43 ein vergrößertes Infarktvolumen, eine erhöhte Apoptoserate und gesteigerte post-ischämische Inflammation aufwiesen.

Des weiteren wurde eine Beteiligung von Cx43 an der Propagierung von Zelltod nach Ischämie beschrieben (Frantseva et al., 2002b; Rawanduzy et al., 1997). Es wurde angenommen, dass dieser negative Effekt über Wellen von Peri-Infarkt-Depolarisationen vermittelt wurde. Peri-Infarkt-Depolarisationen werden vermutlich über gap junctions propagiert und lösen einen Zelltod aus, der zur Vergrößerung des Läsionsvolumens nach Ischämie beiträgt (Nedergaard, 1996). Aber unabhängig von den Peri-Infarkt-Depolarisationen können auch Stress-Faktoren, die sich negativ auf das Überleben von Zellen auswirken, über die gap junction Kanäle verbreitet werden (Frantseva et al., 2002b; Rami et al., 2001). Man vermutet, dass die nach Blockierung der gap junctions beobachtete Reduktion der Gehirnschäden (Frantseva et al., 2002b; Rami et al., 2001; Rawanduzy et al., 1997) eine Folge der verringerten Kopplung mit einer einhergehenden Verminderung der Peri-Infarkt-Depolarisationen sind. Diese Daten bieten allerdings Anlass zur Diskussion, da Substanzen, die zur Blockierung von gap junctions eingesetzt werden (z.B. Octanol, Halothan, Carbenoxolon), sehr komplexe Mechanismen beeinflussen und zudem neuroprotektive Effekte aufweisen.

Wenn auch an anderen Schlaganfallmodellen gezeigt werden kann, dass die post-ischämische Störung der gap junction vermittelten Kommunikation nachteilige Auswirkungen auf das primär unverletzte Gewebe hat, könnte die gezielte Beeinflussung der gap junction vermittelten Kopplung ein potentieller Angriffspunkt für neue Therapien nach einem Schlaganfall sein. In einer kürzlich veröffentlichten Arbeit haben Li und Kollegen (2005) einen interessanten ersten Schritt gemacht, in dem sie die Wirkung von *Gingko biloba* Extrakt testeten. Sie konnten zeigen, dass eine Gabe des Extraktes vor Induktion der fokalen Ischämie einen neuroprotektiven Effekt hatte. *Gingko biloba* Extrakt hatte die post-ischämische Expression von Cx43 stabilisiert und so vermutlich zu einer verbesserten gap junction vermittelte Kommunikation geführt (Li et al., 2005). Offen bleibt allerdings, ob *Gingko biloba* Extrakt diese Wirkung auch zeigt, wenn es nach dem Schlaganfall gegeben wird.

Die vorgelegte Arbeit zeigt, dass die Expression von Cx43 nach einer fokalen Ischämie in verschiedenen Hirnregionen differentiell verändert war. Das die Läsion unmittelbar umgebende Gewebe unterlag der Bildung einer anisomorphen Gliose. Die daran beteiligten reaktiven Astrozyten wiesen über den gesamten Untersuchungszeitraum eine erhöhte Expression von Cx43 mRNA und Protein auf. Die Astrozyten des somatosensorischen Kortex zeigten eine temporäre Erhöhung von GFAP, was ein Hinweis auf eine isomorphe Gliose ist. Die Anzahl der Cx43 mRNA exprimierenden Zellen war im somatosensorischen Kortex temporär erhöht, während die Expression des Proteins verringert war. Die erhöhte Expression von Cx43 Protein in der Glianarbe lässt eine erhöhte Kopplung der Zellen vermuten. Speziell im Band am Boden der Läsion und im Strom zwischen dem lateralen Ventrikel könnte dies einen Einfluß auf die Proliferation und Migration der Zellen haben. Es ist aber auch möglich, dass die erhöhte Kopplung und damit verbundene gesteigerte interzelluläre Kommunikation das „spatial buffering“ begünstigt. Weiterhin kann die gesteigerte Kopplung für die Glianarbe zum Vorteil sein, um als funktionelle Einheit (Synzytium) agieren zu können. Die Herunterregulation des

Cx43 Proteins im somatosensorischen Kortex lässt eine verminderte Kopplung der Astrozyten vermuten. Unmittelbar nach Induktion der Ischämie kann dies zum Vorteil sein, um eine Propagation von zellschädigenden Molekülen zu unterbinden. Im weiteren Verlauf kann eine verminderte Kommunikation zwischen den Astrozyten, wie oben diskutiert, nachteilige Wirkung haben. Die hier vorgestellten Daten bieten Hinweise auf eine differenzierte räumlich-zeitliche Funktion von Cx43 und geben somit einen weiteren Einblick in die Pathogenese der fokalen Ischämie.

Literaturverzeichnis

Abbott NJ. 2002. Astrocyte-endothelial interactions and blood-brain barrier permeability. *J Anat* 200:629-638.

Abbott NJ, Ronnback L, Hansson E. 2006. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci* 7:41-53.

Aronica E, Gorter JA, Jansen GH, Leenstra S, Yankaya B, Troost D. 2001. Expression of connexin 43 and connexin 32 gap-junction proteins in epilepsy-associated brain tumors and in the perilesional epileptic cortex. *Acta Neuropathol (Berl)* 101:449-459.

Bass NH, Hess HH, Pope A, Thalheimer C. 1971. Quantitative cytoarchitectonic distribution of neurons, glia, and DNA in rat cerebral cortex. *J Comp Neurol* 143:481-490.

Beyer EC, Paul DL, Goodenough DA. 1987. Connexin43: a protein from rat heart homologous to a gap junction protein from liver. *J Cell Biol* 105:2621-2629.

Bidmon HJ, Jancsik V, Schleicher A, Hagemann G, Witte OW, Woodhams P, Zilles K. 1997. Structural alterations and changes in cytoskeletal proteins and proteoglycans after focal cortical ischemia. *Neuroscience* 82:397-420.

Blanc EM, Bruce-Keller AJ, Mattson MP. 1998. Astrocytic gap junctional communication decreases neuronal vulnerability to oxidative stress-induced disruption of Ca²⁺ homeostasis and cell death. *J Neurochem* 70:958-970.

Bochelen D, Mersel M, Behr P, Lutz P, Kupferberg A. 1995. Effect of oxysterol treatment on cholesterol biosynthesis and reactive astrocyte proliferation in injured rat brain cortex. *J Neurochem* 65:2194-2200.

Braun JS, Jander S, Schroeter M, Witte OW, Stoll G. 1996. Spatiotemporal relationship of apoptotic cell death to lymphomonocytic infiltration in photochemically induced focal ischemia of the rat cerebral cortex. *Acta Neuropathol (Berl)* 92:255-263.

Chechneva O, Dinkel K, Schrader D, Reymann KG. 2005. Identification and characterization of two neurogenic zones in interface organotypic hippocampal slice cultures. *Neuroscience* 136:343-355.

Chen Y, Swanson RA. 2003. Astrocytes and brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 23:137-149.

Cheng A, Tang H, Cai J, Zhu M, Zhang X, Rao M, Mattson MP. 2004. Gap junctional communication is required to maintain mouse cortical neural progenitor cells in a proliferative state. *Dev Biol* 272:203-216.

- Coles JA, Deitmer JW. 2005. Extracellular potassium and pH: homeostasis and signalling. In: Kettenmann H, Ransom B, editors. *Neuroglia*. Oxford: Oxford University press. p 334-345.
- Comelli MC, Seren MS, Guidolin D, Manev RM, Favaron M, Rimland JM, Canella R, Negro A, Manev H. 1992. Photochemical stroke and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) mRNA expression. *Neuroreport* 3:473-476.
- Cornell-Bell AH, Finkbeiner SM, Cooper MS, Smith SJ. 1990. Glutamate induces calcium waves in cultured astrocytes: long-range glial signaling. *Science* 247:470-473.
- Dahl E, Manthey D, Chen Y, Schwarz HJ, Chang YS, Lalley PA, Nicholson BJ, Willecke K. 1996. Molecular cloning and functional expression of mouse connexin-30, a gap junction gene highly expressed in adult brain and skin. *J Biol Chem* 271:17903-17910.
- Davalos A. 2005. Thrombolysis in acute ischemic stroke: successes, failures, and new hopes. *Cerebrovasc Dis* 20 Suppl 2:135-9. Epub@2005 Dec 2.:135-139.
- Dermietzel R, Hofstadter F. 1998. Gap junctions in health and disease. *Virchows Arch* 432:177-186.
- Dermietzel R, Spray DC. 1993. Gap junctions in the brain: where, what type, how many and why? *Trends Neurosci* 16:186-192.
- Dietrich WD, Truettner J, Prado R, Stagliano NE, Zhao W, Busto R, Ginsberg MD, Watson BD. 2000. Thromboembolic events lead to cortical spreading depression and expression of c-fos, brain-derived neurotrophic factor, glial fibrillary acidic protein, and heat shock protein 70 mRNA in rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 20:103-111.
- Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA. 1999. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci* 22:391-397.
- Dirnagl U, Priller J. 2005. Focal cerebral ischemia: the multifaceted role of glia cells. In: Kettenmann H, Ransom BR, editors. *Neuroglia*. Oxford University Press. p 511-520.
- Duffy HS, Ashton AW, O'Donnell P, Coombs W, Taffet SM, Delmar M, Spray DC. 2004. Regulation of connexin43 protein complexes by intracellular acidification. *Circ Res* 94:215-222.
- Duggal N, Schmidt-Kastner R, Hakim AM. 1997. Nestin expression in reactive astrocytes following focal cerebral ischemia in rats. *Brain Res* 768:1-9.
- Duval N, Gomes D, Calaora V, Calabrese A, Meda P, Bruzzone R. 2002. Cell coupling and Cx43 expression in embryonic mouse neural progenitor cells. *J Cell Sci* 115:3241-3251.
- Ernst C, Christie BR. 2006. The putative neural stem cell marker, nestin, is expressed in heterogeneous cell types in the adult rat neocortex. *Neuroscience* 138:183-188.

- Fabricsius M, Fuhr S, Bhatia R, Boutelle M, Hashemi P, Strong AJ, Lauritzen M. 2006. Cortical spreading depression and peri-infarct depolarization in acutely injured human cerebral cortex. *Brain* 129:778-790.
- Fernaund-Espinosa I, Nieto-Sampedro M, Bovolenta P. 1993. Differential activation of microglia and astrocytes in aniso- and isomorphic gliotic tissue. *Glia* 8:277-291.
- Finger S, Koehler PJ, Jagella C. 2004. The Monakow concept of diaschisis: origins and perspectives. *Arch Neurol* 61:283-288.
- Fonseca CG, Green CR, Nicholson LF. 2002. Upregulation in astrocytic connexin 43 gap junction levels may exacerbate generalized seizures in mesial temporal lobe epilepsy. *Brain Res* 929:105-116.
- Frahm C, Haupt C, Weinandy F, Siegel G, Bruehl C, Witte OW. 2004. Regulation of GABA transporter mRNA and protein after photothrombotic infarct in rat brain. *J Comp Neurol* 478:176-188.
- Frantseva MV, Kokarovtseva L, Naus CG, Carlen PL, MacFabe D, Perez Velazquez JL. 2002a. Specific gap junctions enhance the neuronal vulnerability to brain traumatic injury. *J Neurosci* 22:644-653.
- Frantseva MV, Kokarovtseva L, Perez Velazquez JL. 2002b. Ischemia-induced brain damage depends on specific gap-junctional coupling. *J Cereb Blood Flow Metab* 22:453-462.
- Gass P, Spranger M, Herdegen T, Bravo R, Kock P, Hacke W, Kiessling M. 1992. Induction of FOS and JUN proteins after focal ischemia in the rat: differential effect of the N-methyl-D-aspartate receptor antagonist MK-801. *Acta Neuropathol (Berl)* 84:545-553.
- Goings GE, Sahni V, Szele FG. 2004. Migration patterns of subventricular zone cells in adult mice change after cerebral cortex injury. *Brain Res* 996:213-226.
- Goodenough DA, Paul DL. 2003. Beyond the gap: functions of unpaired connexon channels. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4:285-294.
- Haas B, Schipke CG, Peters O, Sohl G, Willecke K, Kettenmann H. 2006. Activity-dependent ATP-waves in the Mouse Neocortex are Independent from Astrocytic Calcium Waves. *Cereb Cortex* 16:237-246.
- Hansson E. 1988. Astroglia from defined brain regions as studied with primary cultures. *Prog Neurobiol* 30:369-397.
- Haydon PG. 2001. GLIA: listening and talking to the synapse. *Nat Rev Neurosci* 2:185-193.

- Hill CE, Rummery N, Hickey H, Sandow SL. 2002. Heterogeneity in the distribution of vascular gap junctions and connexins: implications for function. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 29:620-625.
- Hossain MZ, Murphy LJ, Hertzberg EL, Nagy JI. 1994a. Phosphorylated forms of connexin43 predominate in rat brain: demonstration by rapid inactivation of brain metabolism. *J Neurochem* 62:2394-2403.
- Hossain MZ, Peeling J, Sutherland GR, Hertzberg EL, Nagy JI. 1994b. Ischemia-induced cellular redistribution of the astrocytic gap junctional protein connexin43 in rat brain. *Brain Res* 652:311-322.
- Hossmann KA. 1994. Viability thresholds and the penumbra of focal ischemia. *Ann Neurol* 36:557-565.
- Hossmann KA. 1999. The hypoxic brain. Insights from ischemia research. *Adv Exp Med Biol* 474:155-69.
- Jander S, Kraemer M, Schroeter M, Witte OW, Stoll G. 1995. Lymphocytic infiltration and expression of intercellular adhesion molecule-1 in photochemically induced ischemia of the rat cortex. *J Cereb Blood Flow Metab* 15:42-51.
- Kang J, Jiang L, Goldman SA, Nedergaard M. 1998. Astrocyte-mediated potentiation of inhibitory synaptic transmission. *Nat Neurosci* 1:683-692.
- Kawahara N, Ruetzler CA, Mies G, Klatzo I. 1999. Cortical spreading depression increases protein synthesis and upregulates basic fibroblast growth factor. *Exp Neurol* 158:27-36.
- Kobori H, Harrison-Bernard LM, Navar LG. 2001. Enhancement of angiotensinogen expression in angiotensin II-dependent hypertension. *Hypertension* 37:1329-1335.
- Krushel LA, Sporns O, Cunningham BA, Crossin KL, Edelman GM. 1995. Neural cell adhesion molecule (N-CAM) inhibits astrocyte proliferation after injury to different regions of the adult rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:4323-4327.
- Lauritzen M, Hansen AJ. 1992. The effect of glutamate receptor blockade on anoxic depolarization and cortical spreading depression. *J Cereb Blood Flow Metab* 12:223-229.
- Lee CY, Pappas GD, Kriho V, Huang BM, Yang HY. 2003. Proliferation of a subpopulation of reactive astrocytes following needle-insertion lesion in rat. *Neurol Res* 25:767-776.
- Lendahl U, Zimmerman LB, McKay RD. 1990. CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell* 60:585-595.

- Li WE, Ochalski PA, Hertzberg EL, Nagy JI. 1998. Immunorecognition, ultrastructure and phosphorylation status of astrocytic gap junctions and connexin43 in rat brain after cerebral focal ischaemia. *Eur J Neurosci* 10:2444-2463.
- Li Y, Chopp M. 1999. Temporal profile of nestin expression after focal cerebral ischemia in adult rat. *Brain Res* 838:1-10.
- Li Z, Lin XM, Gong PL, Zeng FD, Du GH. 2005. Effects of Gingko biloba extract on gap junction changes induced by reperfusion/reoxygenation after ischemia/hypoxia in rat brain. *Am J Chin Med* 33:923-934.
- Lin JH, Takano T, Cotrina ML, Arcuino G, Kang J, Liu S, Gao Q, Jiang L, Li F, Lichtenberg-Frate H, Haubrich S, Willecke K, Goldman SA, Nedergaard M. 2002. Connexin 43 enhances the adhesivity and mediates the invasion of malignant glioma cells. *J Neurosci* 22:4302-4311.
- Lin JH, Weigel H, Cotrina ML, Liu S, Bueno E, Hansen AJ, Hansen TW, Goldman S, Nedergaard M. 1998. Gap-junction-mediated propagation and amplification of cell injury. *Nat Neurosci* 1:494-500.
- Lin JH, Yang J, Liu S, Takano T, Wang X, Gao Q, Willecke K, Nedergaard M. 2003. Connexin mediates gap junction-independent resistance to cellular injury. *J Neurosci* 23:430-441.
- Liu HM, Chen HH. 1994. Correlation between fibroblast growth factor expression and cell proliferation in experimental brain infarct: studied with proliferating cell nuclear antigen immunohistochemistry. *J Neuropathol Exp Neurol* 53:118-126.
- Manev H, Kharlamov A, Armstrong DM. 1994. Photochemical brain injury in rats triggers DNA fragmentation, p53 and HSP72. *Neuroreport* 5:2661-2664.
- Mies G. 1993. Inhibition of protein synthesis during repetitive cortical spreading depression. *J Neurochem* 60:360-363.
- Miyake T, Hattori T, Fukuda M, Kitamura T, Fujita S. 1988. Quantitative studies on proliferative changes of reactive astrocytes in mouse cerebral cortex. *Brain Res* 451:133-138.
- Monnerie H, Esquenazi S, Shashidhara S, Le Roux PD. 2005. Beta-amyloid-induced reactive astrocytes display altered ability to support dendrite and axon growth from mouse cerebral cortical neurons in vitro. *Neurol Res* 27:525-532.
- Nagy JI, Dudek FE, Rash JE. 2004. Update on connexins and gap junctions in neurons and glia in the mammalian nervous system. *Brain Res Brain Res Rev* 47:191-215.
- Nagy JI, Patel D, Ochalski PA, Stelmack GL. 1999. Connexin30 in rodent, cat and human brain: selective expression in gray matter astrocytes, co-localization with connexin43 at gap junctions and late developmental appearance. *Neuroscience* 88:447-468.

- Nagy JI, Rash JE. 2000. Connexins and gap junctions of astrocytes and oligodendrocytes in the CNS. *Brain Res Brain Res Rev* 32:29-44.
- Nakase T, Fushiki S, Naus CC. 2003a. Astrocytic gap junctions composed of connexin 43 reduce apoptotic neuronal damage in cerebral ischemia. *Stroke* 34:1987-1993.
- Nakase T, Fushiki S, Sohl G, Theis M, Willecke K, Naus CC. 2003b. Neuroprotective role of astrocytic gap junctions in ischemic stroke. *Cell Commun Adhes* 10:413-417.
- Nakase T, Sohl G, Theis M, Willecke K, Naus CC. 2004. Increased apoptosis and inflammation after focal brain ischemia in mice lacking connexin43 in astrocytes. *Am J Pathol* 164:2067-2075.
- Nakatomi H, Kuriu T, Okabe S, Yamamoto S, Hatano O, Kawahara N, Tamura A, Kirino T, Nakafuku M. 2002. Regeneration of hippocampal pyramidal neurons after ischemic brain injury by recruitment of endogenous neural progenitors. *Cell* 110:429-441.
- Naus CC, Bechberger JF, Paul DL. 1991. Gap junction gene expression in human seizure disorder. *Exp Neurol* 111:198-203.
- Naus CC, Bechberger JF, Zhang Y, Venance L, Yamasaki H, Juneja SC, Kidder GM, Giaume C. 1997. Altered gap junctional communication, intercellular signaling, and growth in cultured astrocytes deficient in connexin43. *J Neurosci Res* 49:528-540.
- Naus CC, Ozog MA, Bechberger JF, Nakase T. 2001. A neuroprotective role for gap junctions. *Cell Commun Adhes* 8:325-328.
- Nedergaard M. 1994. Direct signaling from astrocytes to neurons in cultures of mammalian brain cells. *Science* 263:1768-1771.
- Nedergaard M. 1996. Spreading depression as a contributor to ischemic brain damage. *Adv Neurol* 71:75-83.
- Nedergaard M, Ransom B, Goldman SA. 2003. New roles for astrocytes: redefining the functional architecture of the brain. *Trends Neurosci* 26:523-530.
- Neumann-Haefelin T, Bosse F, Redecker C, Muller HW, Witte OW. 1999. Upregulation of GABAA-receptor alpha1- and alpha2-subunit mRNAs following ischemic cortical lesions in rats. *Brain Res* 816:234-237.
- Neumann-Haefelin T, Staiger JF, Redecker C, Zilles K, Fritschy JM, Mohler H, Witte OW. 1998. Immunohistochemical evidence for dysregulation of the GABAergic system ipsilateral to photochemically induced cortical infarcts in rats. *Neuroscience* 87:871-879.
- Newman EA. 2003. New roles for astrocytes: regulation of synaptic transmission. *Trends Neurosci* 26:536-542.

Nolte CH, Jungehülsing GJ, Villringer A. 2002. Durchblutungsmangel setzt Kaskade der Zerstörung in Gang. *Neurotransmitter* 1:2-5.

Norenberg MD. 2005. The reactive astrocyte. In: Aschner M, editor. *The role of glia in neurotoxicity*. Boca Raton: FL: CRC Press. p 73-92.

Panickar KS, Norenberg MD. 2005. Astrocytes in cerebral ischemic injury: morphological and general considerations. *Glia* 50:287-298.

Pfaffl MW. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29:2002-2007.

Qiu C, Coutinho P, Frank S, Franke S, Law LY, Martin P, Green CR, Becker DL. 2003. Targeting connexin43 expression accelerates the rate of wound repair. *Curr Biol* 13:1697-1703.

Rami A, Volkmann T, Winckler J. 2001. Effective reduction of neuronal death by inhibiting gap junctional intercellular communication in a rodent model of global transient cerebral ischemia. *Exp Neurol* 170:297-304.

Rao VL, Dogan A, Todd KG, Bowen KK, Kim BT, Rothstein JD, Dempsey RJ. 2001. Antisense knockdown of the glial glutamate transporter GLT-1, but not the neuronal glutamate transporter EAAC1, exacerbates transient focal cerebral ischemia-induced neuronal damage in rat brain. *J Neurosci* 21:1876-1883.

Rash JE, Staines WA, Yasumura T, Patel D, Furman CS, Stelmack GL, Nagy JI. 2000. Immunogold evidence that neuronal gap junctions in adult rat brain and spinal cord contain connexin-36 but not connexin-32 or connexin-43. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:7573-7578.

Rash JE, Yasumura T, Davidson KG, Furman CS, Dudek FE, Nagy JI. 2001a. Identification of cells expressing Cx43, Cx30, Cx26, Cx32 and Cx36 in gap junctions of rat brain and spinal cord. *Cell Commun Adhes* 8:315-320.

Rash JE, Yasumura T, Dudek FE, Nagy JI. 2001b. Cell-specific expression of connexins and evidence of restricted gap junctional coupling between glial cells and between neurons. *J Neurosci* 21:1983-2000.

Rawanduzy A, Hansen A, Hansen TW, Nedergaard M. 1997. Effective reduction of infarct volume by gap junction blockade in a rodent model of stroke. *J Neurosurg* 87:916-920.

Ridet JL, Malhotra SK, Privat A, Gage FH. 1997. Reactive astrocytes: cellular and molecular cues to biological function. *Trends Neurosci* 20:570-577.

Rohlmann A, Laskawi R, Hofer A, Dobo E, Dermietzel R, Wolff JR. 1993. Facial nerve lesions lead to increased immunostaining of the astrocytic gap junction protein (connexin 43) in the corresponding facial nucleus of rats. *Neurosci Lett* 154:206-208.

- Rosenberg PA. 1991. Accumulation of extracellular glutamate and neuronal death in astrocyte-poor cortical cultures exposed to glutamine. *Glia* 4:91-100.
- Rothstein JD, Dykes-Hoberg M, Pardo CA, Bristol LA, Jin L, Kuncl RW, Kanai Y, Hediger MA, Wang Y, Schielke JP, Welty DF. 1996. Knockout of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate. *Neuron* 16:675-686.
- Röther J. 2000. "Spreading depression" und Periinfarktdepolarisationen. *Nervenarzt* 71:84-90.
- Sahin KS, Mahmood A, Li Y, Yavuz E, Chopp M. 1999. Expression of nestin after traumatic brain injury in rat brain. *Brain Res* 840:153-157.
- Scemes E, Duval N, Meda P. 2003. Reduced expression of P2Y1 receptors in connexin43-null mice alters calcium signaling and migration of neural progenitor cells. *J Neurosci* 23:11444-11452.
- Schipke CG, Boucsein C, Ohlemeyer C, Kirchhoff F, Kettenmann H. 2002. Astrocyte Ca²⁺ waves trigger responses in microglial cells in brain slices. *FASEB J* 16:255-257.
- Schroeter M, Jander S, Huitinga I, Witte OW, Stoll G. 1997. Phagocytic response in photochemically induced infarction of rat cerebral cortex. The role of resident microglia. *Stroke* 28:382-386.
- Schroeter M, Jander S, Witte OW, Stoll G. 1994. Local immune responses in the rat cerebral cortex after middle cerebral artery occlusion. *J Neuroimmunol* 55:195-203.
- Schroeter M, Jander S, Witte OW, Stoll G. 1999. Heterogeneity of the microglial response in photochemically induced focal ischemia of the rat cerebral cortex. *Neuroscience* 89:1367-1377.
- Schroeter M, Schiene K, Kraemer M, Hagemann G, Weigel H, Eysel UT, Witte OW, Stoll G. 1995. Astroglial responses in photochemically induced focal ischemia of the rat cortex. *Exp Brain Res* 106:1-6.
- Simon AM, Goodenough DA. 1998. Diverse functions of vertebrate gap junctions. *Trends Cell Biol* 8:477-483.
- Siushansian R, Bechberger JF, Cechetto DF, Hachinski VC, Naus CC. 2001. Connexin43 null mutation increases infarct size after stroke. *J Comp Neurol* 440:387-394.
- Sohl G, Guldenagel M, Beck H, Teubner B, Traub O, Gutierrez R, Heinemann U, Willecke K. 2000. Expression of connexin genes in hippocampus of kainate-treated and kindled rats under conditions of experimental epilepsy. *Brain Res Mol Brain Res* 83:44-51.
- Song H, Stevens CF, Gage FH. 2002. Astroglia induce neurogenesis from adult neural stem cells. *Nature* 417:39-44.

- Stichel CC, Lausberg F, Hermanns S, Muller HW. 1999. Scar modulation in subacute and chronic CNS lesions: Effects on axonal regeneration. *Restor Neurol Neurosci* 15:1-15.
- Stichel CC, Muller HW. 1998. The CNS lesion scar: new vistas on an old regeneration barrier. *Cell Tissue Res* 294:1-9.
- Theriault E, Frankenstein UN, Hertzberg EL, Nagy JI. 1997. Connexin43 and astrocytic gap junctions in the rat spinal cord after acute compression injury. *J Comp Neurol* 382:199-214.
- Traystman RJ. 2003. Animal models of focal and global cerebral ischemia. *ILAR J* 44:85-95.
- Tsacopoulos M, Magistretti PJ. 1996. Metabolic coupling between glia and neurons. *J Neurosci* 16:877-885.
- Ullian EM, Sapperstein SK, Christopherson KS, Barres BA. 2001. Control of synapse number by glia. *Science* 291:657-661.
- von Monakow C. 1914. Die Lokalisation im Grosshirn und der Abbau der Funktion durch kortikale Herde. Wiesbaden, Germany: JF Bergmann.
- Wallraff A, Odermatt B, Willecke K, Steinhauser C. 2004. Distinct types of astroglial cells in the hippocampus differ in gap junction coupling. *Glia* 48:36-43.
- Watson BD, Dietrich WD, Busto R, Wachtel MS, Ginsberg MD. 1985. Induction of reproducible brain infarction by photochemically initiated thrombosis. *Ann Neurol* 17:497-504.
- Wilkin GP, Marriott DR, Cholewinski AJ. 1990. Astrocyte heterogeneity. *Trends Neurosci* 13:43-46.
- Witte OW. 1998. Lesion-induced plasticity as a potential mechanism for recovery and rehabilitative training. *Curr Opin Neurol* 11:655-662.
- Witte OW, Bidmon HJ, Schiene K, Redecker C, Hagemann G. 2000. Functional differentiation of multiple perilesional zones after focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 20:1149-1165.
- Witte OW, Stoll G. 1997. Delayed and remote effects of focal cortical infarctions: secondary damage and reactive plasticity. *Adv Neurol* 73:207-27.:207-227.
- Yamamoto T, Ochalski A, Hertzberg EL, Nagy JI. 1990. On the organization of astrocytic gap junctions in rat brain as suggested by LM and EM immunohistochemistry of connexin43 expression. *J Comp Neurol* 302:853-883.
- Yokota H, Yamamoto Y, Naoe Y, Fuse A, Sato H, Unemoto K, Kurokawa A. 2000. Measurements of cortical cellular pH by intracranial tonometer in severe head injury. *Crit Care Med* 28:3275-3280.
- Zahs KR, Kofuji P, Meier C, Dermietzel R. 2003. Connexin immunoreactivity in glial cells of the rat retina. *J Comp Neurol* 455:531-546.

Zonta M, Angulo MC, Gobbo S, Rosengarten B, Hossmann KA, Pozzan T, Carmignoto G. 2003. Neuron-to-astrocyte signaling is central to the dynamic control of brain microcirculation. *Nat Neurosci* 6:43-50.

Anhang

Tabellen

Tabelle 1: Rezepte der verwendeten Pufferlösungen

In situ Hybridisierung

Hybridisierungspuffer

50 %	Formamid
10 %	Dextransulfat
10 mM	Trishydroxymethylaminomethan-HCl (pH 7,5)
10 mM	Na ₂ HPO ₄ × 2H ₂ O (pH 6,8)
0,3 M	NaCl
5 mM	EDTA
1 mg/ml	t-RNA (von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , Sigma-Aldrich)
1 ×	Denhardt's Lösung (Sigma-Aldrich)

PBS (pH 7,4)

0,14 M	NaCl
16 mM	Na ₂ HPO ₄ × 2H ₂ O
2,7 mM	KCl
1,5 mM	KH ₂ PO ₄

2 × SSC

0,3 M	NaCl
30 mM	Trinatriumcitrat × 2H ₂ O

1 × SSC

0,15 M	NaCl
15 mM	Trinatriumcitrat × 2H ₂ O

0,2 × SSC

30 mM	NaCl
3 mM	Trinatriumcitrat × 2H ₂ O

0,1 × SSC

15 mM	NaCl
1,5 mM	Trinatriumcitrat × 2H ₂ O

TBS (pH 7,5)

0,1 M	Trishydroxymethylaminomethan-HCl
0,25 M	NaCl

Detektionspuffer (pH 9,5)

0,1 M	Trishydroxymethylaminomethan-HCl
0,1 M	NaCl
50 mM	MgCl ₂

Detektionspuffer (pH 8,0)

0,1 M	Trishydroxymethylaminomethan-HCl
0,1 M	NaCl
10 mM	MgCl ₂

Fortsetzung Tabelle 1: Rezepte der verwendeten Pufferlösungen**Immunohistochemie****PBS (pH 7,4)**

0,125 M	NaCl
8 mM	Na ₂ HPO ₄
1,75 mM	NaH ₂ PO ₄ × H ₂ O

TBS (pH 7,4)

85 mM	Trishydroxymethylaminomethan-HCl
15 mM	Trishydroxymethylaminomethan
0,15 M	NaCl

Anti-freeze-Puffer (pH 7,4)

300 ml	Ethylenglycol
0,75 M	Glucose
3 mM	Natriumazid
1,5 mM	Na ₂ HPO ₄
0,9 mM	NaH ₂ PO ₄ × H ₂ O

Tabelle 2: verwendete Antikörper

Antikörper	Verdünnung	Firma und Bestellnummer
Primäre		
rabbit anti-Cx43	1:300	Zymed, 71-0700
mouse anti-Cx43	1:500	Sigma, C8093
rabbit anti-GFAP	1:3000	Chemicon, AB5804
mouse anti-GFAP	1:50	Chemicon, MAB360
guinea pig anti-GFAP	1:2000	Advanced Immunochemicals, 31223
rat anti-BrdU	1:500	Oxford Biotechnologies, 0030CX
mouse anti-Nestin	1:500	Chemicon, MAB353
mouse anti-NeuN	1:500	Chemicon, MAB377
rabbit anti-S100β	1:2500	Swant, 37a
sheep anti-DIG	1:500, 1:1000	Roche, 1093274
Sekundäre		
<i>Alexa Fluor 488-konjugiert</i>		
donkey anti-mouse	1:500, 1:250	Molecular Probes, A21202
goat anti-guinea pig	1:500	Molecular Probes, A11073
<i>Rhodamin Red-X-konjugiert</i>		
donkey anti-rat	1:500	Dianova, 712-295-150
donkey anti-guinea pig	1:500	Dianova, 706-296-148
donkey anti-mouse IgM	1:1000	Jackson, 715-296-020
<i>Biotin-konjugiert</i>		
donkey anti-rabbit	1:250, 1:500	Dianova, 711-065-152

Tabelle 3: Primer für *in situ* Hybridisierung und real time RT-PCR

Gen		Primer	Produktlänge (bp)	Quelle
In situ Hybridisierung				
Cx 43	fw rev	5'-CAAGTACGGGATTGAAGAGCAC-3' 5'-GTTCACCCAATGCGACTCTTAC-3'	1016	erstellt mit Primer3
real time RT-PCR				
Cx 43	fw rev	5'- GAGATGCACCTGAAGCAGATTGAA-3' 5'- GATGTTCAAAGCGAGAGACACCAA -3'	308	(Hill et al., 2002)
GAPDH	fw rev	5'- TCC CTC AAG ATT GTC AGC AA-3' 5'- AGA TCC ACA ACG GAT ACA TT-3'	308	(Kobori et al., 2001)

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Familienname: Haupt
 Vorname: Corinna
 Adresse: Dornburger Str. 156
 07743 Jena
 Geburtsdatum: 04.08.1976, Borna
 Staatsbürgerschaft: Deutsch
 Familienstand: ledig
 Kinder: Sohn Étienne Maurice (geboren am 18.08.2001)
 08/2001 - 09/2002 Elternzeit

Schulbildung:

09/1983 - 07/1992 Oberschule "Jury Gagarin" Langenau
 09/1992 - 07/1993 Gymnasium Brand-Erbisdorf
 08/1993 - 06/1994 High-School, Mabank, Texas, USA
 08/1994 - 06/1996 Gymnasium Brand-Erbisdorf, Abitur

wissenschaftlicher Werdegang:

10/1996 - 07/1998 Studium der Biologie an der Friedrich-Schiller-Universität Jena,
 Vordiplom in Biologie
 08/1998 - 09/1999 Erasmus-Student an der Universität Lund, Schweden (Studium der
 Fächer: Neurobiologie, Eukaryotische und Prokaryotische Genetik)
 04/1999 – 08/1999 Masterarbeit zum Thema: „Identification and Characterization of a
 180 kDa Phospholipase A2 and the M-type Receptor for Secreted
 Phospholipase A2 in Dorsal Root Ganglia“ unter Leitung von Marie
 Hornfelt, Professor Martin Kanje und Professor Anders Edström,
 Institut für Tierphysiologie, Universität Lund, Schweden
 10/1999 – 06/2001 Fortsetzung des Studiums der Biologie an der Friedrich-Schiller-
 Universität Jena (Studium der Fächer: Zoologie und Biochemie)
 07/2001 Master of Science der Universität Lund
 seit 10/2002 Doktorandin an der Klinik für Neurologie der Friedrich-Schiller-
 Universität Jena bei Professor Dr. med. Otto W. Witte

Stipendien:

- | | |
|---------|---|
| 11/2005 | Reisestipendium der "Stiftung Felgenhauer" für die Teilnahme an dem Society for Neuroscience 35 th annual meeting 2005, Washington, D.C., USA |
| 6/2006 | Reisestipendium der Neurowissenschaftlichen Gesellschaft für die Teilnahme am 5 th Forum of European Neuroscience meeting 2006, Wien, Österreich |

Eigene Publikationen und Vorträge

Veröffentlichungen in wissenschaftlichen Zeitschriften

C.Frahm, **C.Haupt** and O.W. Witte. GABA Neurons Survive Focal Ischemic Injury, *Neuroscience*, 127 (2004) 341-346

C. Frahm, **C. Haupt**, F. Weinandy, G. Siegel, C. Bruehl, O.W. Witte. Regulation of GABA transporter RNA and protein following photothrombotic infarct in rat brain, *Journal of Comparative Neurology*, 478:176-188 (2004)

C. Haupt. Untersuchungen zur Beteiligung des Connexin 43 am Prozess der reaktiven Astroglie nach fokaler Ischämie bei Ratten. *forum neurologicum* in *Aktuelle Neurologie* 3/2006

C. Haupt, E.A. Tolner, U. Heinemann, O.W. Witte; C. Frahm. The combined use of non-radioactive in situ hybridization and real time RT-PCR to assess gene expression in cryosections, *angenommen bei Brain Research*

C. Haupt, O.W. Witte, C. Frahm. Temporal profile of Connexin 43 expression after photothrombotic lesion in rat brain, *eingereicht bei Neuroscience*

C. Haupt, O.W. Witte, C. Frahm. Involvement of connexin 43 in proliferation and migration of astrocytes after focal ischemic injury, *Manuskript*

Poster

Restorative Neurology and Neuroscience, Special Issue, Abstracts of the 3rd Magdeburg Symposium, Neuroprotection and Neurorepair, Volume 20 number 6, ISSN 0922-6028, Focus 2003: Stroke and Endogenous Stem Cells, May 7-10 2003, Magdeburg, Germany, Reduced GABA transporter density after focal cortical lesion in the rat brain.

C. Frahm, **C. Haupt**, N. Haag, and O.W. Witte

Society for Neuroscience 33th annual meeting 2003, New Orleans

GABA transporter RNA and protein is regulated following photothrombotic infarct in rat brain.

Frahm C., **Haupt C.**, Brühl C., Witte O.W.

Society for Neuroscience 34th annual meeting 2004, San Diego

Cells expressing GABA transporter and GAD mRNA are differentially regulated by focal ischemic injury.

Frahm C., **Haupt C.**, Witte O.W.

Society for Neuroscience 34th annual meeting 2004, San Diego

Astrocytic connexin 43 mRNA is upregulated in the vicinity of the photothrombotic lesion in rat brain.

C. Haupt, O. W. Witte, C. Frahm

Sixth meeting of the German Neuroscience Society, 30th Göttingen Neurobiology Conference 2005

Connexin 43 mRNA and protein are upregulated in the vicinity of the photothrombotic lesion in rat brain.

C. Haupt, O.Waitz, O.W. Witte and C. Frahm

Society for Neuroscience 35th annual meeting 2005, Washington D.C.
Regulation of Connexin 43 mRNA and protein after focal ischemic injury in rats: a time response study.

C. Haupt, Waitz O., Kossut M., Witte O.W., Frahm C.

5th Forum of European Neuroscience 2006, Vienna
Stable expression of Connexin 43 mRNA after kainate induced seizures in rat hippocampus.

C. Haupt, E.A. Tolner, U. Heinemann, O.W. Witte; C. Frahm

Vorträge

Real Time RT-PCR User Meeting 2006 in Berlin, Veranstaltet von der Firma Bio Rad,
Vortrag mit dem Titel: „Stable expression of Connexin 43 mRNA after kainate induced seizures in rat hippocampus“. **C. Haupt**, E.A. Tolner, U. Heinemann, O.W. Witte; C. Frahm

Danksagung

Herrn Professor Dr. med. Otto W. Witte danke ich für die Möglichkeit der Promotion in seiner Klinik. Vor allem danke ich ihm für den gewährten wissenschaftlichen Freiraum, die zur Verfügung gestellten Arbeitsmittel und die sowohl medizinisch als auch philosophisch sehr anregenden Diskussionen meiner Ergebnisse.

Frau Dr. Christiane Frahm möchte ich für die enge Zusammenarbeit, ständige Ansprechbarkeit, die anregenden und aufregenden Diskussionen, die geteilte Freude über geglückte Versuche und das geteilte Leid bei Misserfolgen, für konstruktive Kritik am experimentellen Design und das „Anstacheln“ meines Ehrgeizes danken. Vielen Dank auch für die Unterstützung beim Schreiben der Manuskripte, die Auswahl des Materials für diese Arbeit und für das kritische Lesen meiner Dissertationsschrift.

Für technische Hilfe möchte ich Jessica Heyder, Svetlana Tausch, Ina Ingrisch, Claudia Sommer und Julia Oberland danken.

Meinen Kollegen und Leidensgenossen Gabriele Siegel, Oliver Waitz, Anke Popp, Anja Urbach, Lutz Liebmann, Silvio Schmidt, Anna Stahr, Elena Chanina, Silke Graß, Martin Kluska, Christian Beetz und Marcus-René Lisy möchte ich für ihre Kooperation und Hilfsbereitschaft in methodischen, theoretischen und das Leben im Allgemeinen betreffende Fragen danken.

Ein zusätzlicher Dank gilt meiner Kollegin Anna Stahr, die den undankbaren Job übernommen hatte, die Arbeit nach Form-, Rechtschreib- und Grammatikfehlern zu durchforsten.

Ein ganz besonderer Dank gilt meiner Mutter, meiner Schwester und meinen Großeltern, ohne deren Unterstützung bei der Betreuung meines Sohnes die Besuche von Kongressen und Weiterbildungskursen nicht möglich gewesen wären. Außerdem haben sie geduldig über Jahre hinweg akzeptiert, dass ich lieber studieren und forschen wollte, als Geld zu verdienen. Vielen Dank vor allem auch für die finanzielle Unterstützung, am Anfang für Studienliteratur und später für Kindersachen.

Meinem Freund Rudolph Marsch möchte ich dafür danken, dass er an mich geglaubt hat, waren meine Ideen auch noch so abgefahren. Wenn auch oft nur aus der Ferne, konnte er mich wieder aufbauen wenn ich „Schwarz“ sah und mir helfen, mich wieder auf das

Wesentliche zu konzentrieren. Er war immer ein kritischer Leser meiner Manuskripte und der Dissertation. Die Diskussionen waren anregend und lehrreich (hoffentlich für beide Seiten). Danke, dass ich Dich an meiner Seite haben darf.

All meinen Freunden möchte ich für ihre moralische Unterstützung und zugesprochenen Mut danken und dafür, dass sie noch immer meine Freunde sind, obwohl ich in den letzten 4 Jahren wenig Zeit hatte.

Ich möchte mich bei allen Lehrern bedanken, die das naturwissenschaftliche Interesse und den Wunsch, Dinge zu hinterfragen und zu analysieren, in mir geweckt haben. Für meine Laufbahn als Wissenschaftlerin haben Sie den Grundstein gelegt. Namentlich wären vor allem zu nennen: Frau Lehman (Lehrerin für Mathematik und Geographie), Herr Jakobczynski (Lehrer für Biologie), Frau Lorenz (Lehrerin für Biologie), Frau Wolf (Lehrerin für Biologie), Herr Zimmermann (Lehrer für Deutsch und Geschichte) und Herr Weinert (Lehrer für Chemie).

Meinem Sohn Étienne Maurice ist diese Arbeit gewidmet. Ich möchte ihm danken, dass er so viel Geduld mit mir hatte. Seinen Wünschen, z.B. auch mal „Mittagskind“ zu sein, konnte ich nur selten nachkommen. Meist war er einer der letzten, die noch im Kindergarten spielten, wenn Mama endlich kam.

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Quellen angefertigt habe. Bei der Auswahl und Auswertung des Materials wurde ich von Professor Dr. med. Otto W. Witte und Frau Dr. Christiane Frahm unterstützt.

Ich versichere, dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht und mit der vorliegenden Abhandlung an keiner anderen Hochschule die Eröffnung eines Verfahrens zum Erwerb eines akademischen Grades beantragt habe. Mir ist die geltende Promotionsordnung der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät bekannt. Ich habe weder die Hilfe eines Promotionsberaters in Anspruch genommen, noch haben Dritte unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertationsschrift stehen.

Jena, im September 2006

Corinna Haupt